

14.09.2004

日 本 国 特 許 庁  
JAPAN PATENT OFFICE

別紙添付の書類に記載されている事項は下記の出願書類に記載されている事項と同一であることを証明する。

This is to certify that the annexed is a true copy of the following application as filed with this Office.

出 願 年 月 日  
Date of Application: 2004年 3月 4日

出 願 番 号  
Application Number: 特願2004-060283  
[ST. 10/C]: [JP2004-060283]

REC'D 02 DEC 2004

WIPO PCT

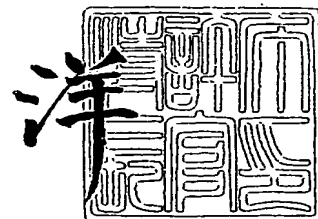
出 願 人  
Applicant(s): 東洋紡績株式会社

**PRIORITY DOCUMENT**  
SUBMITTED OR TRANSMITTED IN  
COMPLIANCE WITH  
RULE 17.1(a) OR (b)

2004年11月18日

特許庁長官  
Commissioner,  
Japan Patent Office

小 川



BEST AVAILABLE COPY

【書類名】 特許願  
【整理番号】 CN04-0177  
【提出日】 平成16年 3月 4日  
【あて先】 特許庁長官 殿  
【国際特許分類】 C12N 15/00  
【発明者】  
    【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番 24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ  
                                研究所内  
    【氏名】 竹嶋 誠嗣  
【発明者】  
    【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番 24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ  
                                研究所内  
    【氏名】 松村 肇庸  
【発明者】  
    【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番 24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ  
                                研究所内  
    【氏名】 岸本 高英  
【発明者】  
    【住所又は居所】 福井県敦賀市東洋町 10番 24号 東洋紡績株式会社敦賀バイオ  
                                研究所内  
    【氏名】 岡 正則  
【特許出願人】  
    【識別番号】 000003160  
    【氏名又は名称】 東洋紡績株式会社  
    【代表者】 津村 準二  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003- 80244  
    【出願日】 平成15年 3月24日  
【先の出願に基づく優先権主張】  
    【出願番号】 特願2003- 80310  
    【出願日】 平成15年 3月24日  
【手数料の表示】  
    【予納台帳番号】 000619  
    【納付金額】 21,000円  
【提出物件の目録】  
    【物件名】 特許請求の範囲 1  
    【物件名】 明細書 1  
    【物件名】 図面 1  
    【物件名】 要約書 1

**【書類名】 特許請求の範囲****【請求項 1】**

野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQGDH) よりも二糖類に対する作用性が低下した、及び／又は、安定性が向上した改変型 PQQGDH。

**【請求項 2】**

Acinetobacter 属由来 PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、グルコースや PQQ との結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されている、請求項 1 に記載の改変型 PQQGDH。

**【請求項 3】**

Acinetobacter 属由来 PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されている、請求項 1 に記載の改変型 PQQGDH。

**【請求項 4】**

野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQGDH) よりも安定性が向上した改変型 PQQGDH。

**【請求項 5】**

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH をコードする遺伝子。

**【請求項 6】**

請求項 5 に記載の遺伝子を含むベクター。

**【請求項 7】**

請求項 6 に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

**【請求項 8】**

請求項 7 に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型 PQQGDH の製造法。

**【請求項 9】**

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコースアッセイキット。

**【請求項 10】**

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコースセンサー。

**【請求項 11】**

請求項 1～4 のいずれかに記載の改変型 PQQGDH を含むグルコース測定方法。

**【請求項 12】**

野生型酵素の活性型立体構造における活性中心から半径 15 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる請求項 1 に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

**【請求項 13】**

野生型酵素の活性型立体構造において基質の 1 位の炭素に結合する OH 基から半径 10 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる請求項 1 に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

**【請求項 14】**

野生型酵素の活性型立体構造において基質の 2 位の炭素に結合する OH 基から半径 10 Å 以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる請求項 1 に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

## 【書類名】 明細書

【発明の名称】 基質特異性または安定性に優れたピロロキノリンキノン (PQQ) 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ改変体

## 【技術分野】

## 【0001】

本発明は基質特異性及び／又は熱安定性が改良された改変型グルコースデヒドロゲナーゼ (GDH) に関し、詳しくはピロロキノリンキノン (PQQ) を補酵素とする改変型 PQQ 依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (以下 PQQGDH とも略記する。)、その製造法及びグルコースセンサーに関する。

本発明の改変型 PQQGDH は、臨床検査や食品分析などにおけるグルコースの定量に有用である。

## 【背景技術】

## 【0002】

PQQGDH は、ピロロキノリンキノン (PQQ) を補酵素とするグルコースデヒドロゲナーゼである。グルコースを酸化してグルコノラクトンを生成する反応を触媒するから、血糖の測定に用いることができる。血中グルコース濃度は、糖尿病の重要なマーカーとして臨床診断上きわめて重要な指標である。現在、血中グルコース濃度の測定は、グルコースオキシダーゼを使用したバイオセンサーを用いる方法が主流となっているが、反応が溶存酸素濃度に影響されるから、測定値に誤差が生じる可能性があった。このグルコースオキシダーゼにかわる新たな酵素として PQQ 依存性グルコース脱水素酵素が注目されている。

## 【0003】

我々のグループは、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517 株が、PQQ 依存性グルコース脱水素酵素を産生することを見出し、遺伝子のクローニングならびに高発現系を構築した (特許文献 1 参照)。PQQ 依存性グルコース脱水素酵素はグルコースオキシダーゼに比べて基質特異性、熱安定性に問題点があった。

【特許文献 1】 特開平 11-243949 号公報

## 【発明の開示】

## 【発明が解決しようとする課題】

## 【0004】

本発明は、従来技術の課題を背景になされたもので、PQQGDH の基質特異性及び／又は熱安定性を課題としてその改良に関するものである。

## 【課題を解決するための手段】

## 【0005】

本発明者らは上記課題を解決するため、鋭意研究した結果、遂に本発明を完成するに至った。即ち本発明は、

1. 野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ (PQQGDH) よりも二糖類に対する作用性が低下した、及び／又は、安定性が向上した改変型 PQQGDH。
2. 野生型のグルコースデヒドロゲナーゼよりも二糖類に対する作用性が低下したことを特徴とする 1. に記載の改変型 PQQGDH。
3. 二糖類がマルトースであることを特徴とする 2. に記載の改変型 PQQGDH。
4. マルトースに対する作用性がグルコースに対する作用性の 90% 以下であることを特徴とする 2. に記載の改変型 PQQGDH。
5. 二糖類に対する K<sub>m</sub> 値が大きくなったことを特徴とする 2. に記載の改変型 PQQGDH。
6. 二糖類がマルトースであることを特徴とする 5. に記載の改変型 PQQGDH。
7. マルトースに対する K<sub>m</sub> 値が 8 mM 以上であることを特徴とする 5. に記載の改変型 PQQGDH。

8. 二糖類に対するKm値がグルコースに対するKm値よりも大きいことを特徴とする2. 記載の改変型PQQGDH。

9. 二糖類がマルトースであることを特徴とする8. 記載の改変型PQQGDH。

10. マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値の1.5倍以上であることを特徴とする8. 記載の改変型PQQGDH。

11. *Acinetobacter*属由来PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、グルコースやPQQとの結合に関与するアミノ酸及び/またはその周辺のアミノ酸が置換されている、2. に記載の改変型PQQGDH。

12. *Acinetobacter*属由来PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び/またはその周辺のアミノ酸が置換されている、2. に記載の改変型PQQGDH。

13. *Acinetobacter*属由来PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、67位、68位、69位、76位、89位、129位、130位、131位、167位、168位、169位、170位、341位、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位、249位、300位、349位及び429位からなる群から選ばれる少なくとも1つの位置のアミノ酸が置換されている、2. に記載の改変型PQQGDH。

14. アミノ酸置換が、Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, N167E, N167L, N167G, N167T, N167S, N167A, N167M, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169D, L169S, L169W, L169Y, L169A, L169N, L169M, L169V, L169C, L169Q, L169H, L169F, L169R, L169K, L169I, L169T, L169P, L169G, L169E, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, A170M, K89E, K300R, S207C, N188I, T349S, K300T, L174F, K49N, S189G, F215Y, S189G, E245D, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, A351T, P67K, E68K, P67D, E68T, I69C, P67R, E68R, E129R, K130G, P131G, E129N, P131T, E129Q, K130T, P131R, E129A, K130R, P131K, E341L, M342P, A343R, A343I, E341P, M342V, E341S, M342I, A343C, M342R, A343N, T349S, T349P, T349Y, N429F, N429P, N429L, N429Y, からなる群から選択される13. に記載の改変型PQQGDH。

15. アミノ酸置換が、Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169A, L169V, L169H, L169K, L169D, L169S, L169N, L169G, L169C, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (K89E+K300R), (Q168A+L169D), (Q168S+L169S), (N167E+Q168G+L169T), (N167S+Q168N+L169R), (Q168G+L1

69T), (N167G+Q168S+L169Y), (N167L+Q168S+L169G), (N167G+Q168S+L169S+L174F+K49N), (Q168N+L168N+S189R), (N167E+Q168G+L169A+S189G), (N167G+Q168R+L169A), (N167S+Q168G+L169A), (N167G+Q168V+L169S), (N167S+Q168V+L169S), (N167T+Q168I+L169G), (N167G+Q168W+L169N), (N167G+Q168S+L169N), (N167G+Q168S+L169V), (Q168R+L169C), (N167S+Q168L+L168G), (Q168C+L169S), (N167T+Q168N+L169K), (N167G+Q168T+L169A+S207C), (N167A+Q168A+L169P), (N167G+Q168S+L169G), (N167G+Q168G), (N167G+Q168D+L169K), (Q168P+L169G), (N167G+Q168N+L169S), (Q168S+L169G), (N188I+T349S), (N167G+Q168G+L169A+F215Y), (N167G+Q168T+L169G), (Q168G+L169V), (N167G+Q168V+L169T), (N167E+Q168N+L169A), (Q168R+L169A), (N167G+Q168R), (N167G+Q168T), (N167G+Q168T+L169Q), (Q168I+L169G+K300T), (N167G+Q168A), (N167T+Q168L+L169K), (N167M+Q168Y+L169G), (N167E+Q168S), (N167G+Q168T+L169V+S189G), (N167G+Q168G+L169C), (N167G+Q168K+L169D), (Q168A+L169D), (Q168S+E245D), (Q168S+L169S), (A351T), (N167S+Q168S+L169S), (Q168I+L169Q), (N167A+Q168S+L169S), (Q168S+L169E), (Q168A+L169G), (Q168S+L169P), (P67K+E68K), (P67R+E68R+I69C), (P67D+E68T+I69C), (E129R+K130G+P131G), (E129Q+K130T+P131R), (E129N+P131T), (E129A+K130R+P131K), (E341L+M342P+A343R), (E341S+M342I), A343I, (E341P+M342V+A343C), (E341P+M342V+A343R), (E341L+M342R+A343N), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169I), (Q168A+L169K), (Q168A+L169M), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169S), (Q168A+L169T), (Q168A+L169V), (Q168A+L169W) 及び (Q168A+L169Y) からなる群から選択され、該アミノ酸置換により基質特異性が向上した13.に記載の改変型PQQGDH。

16. *Acinetobacter* 属由来PQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、428位と429位の間にアミノ酸が挿入されている、2.に記載の改変型PQQGDH。

17. 1.～16.のいずれかに記載の改変型PQQGDHをコードする遺伝子。

18. 17.に記載の遺伝子を含むベクター。

19. 18.に記載のベクターで形質転換された形質転換体。

20. 19.に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型PQQGDHの製造法。

21. 1.～20.のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキット。

22. 1. ~ 20. のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコースセンサー。
23. 1. ~ 20. のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコース測定方法。
24. 野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ(PQQGDH)よりも安定性が向上した改変型PQQGDH。
25. 58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が48%以上であることを特徴とする24. 記載の改変型PQQGDH。
26. 58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が55%以上であることを特徴とする24. 記載の改変型PQQGDH。
27. 58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が70%以上であることを特徴とする24. 記載の改変型PQQGDH。
28. *Acinetobacter* 属由来PQQGDHにおいて、20位、76位、89位、168位、169位、245位、246位及び300位からなる群から選ばれる少なくとも1つの位置のアミノ酸が置換されている、24. に記載のPQQGDH。
29. アミノ酸置換が、K20E, Q76M, Q76G, K89E, Q168A, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, L169D, L169E, L169P, L169S, Q246H, K300R, Q76N, Q76T, Q76K, L169A, L169C, L169E, L169F, L169H, L169K, L169N, L169Q, L169R, L169T, L169Y, L169G及びE245Dからなる群から選択される28. に記載の改変型PQQGDH。
30. アミノ酸置換が、K20E, Q76M, Q76G, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), Q246H, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169K), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169T), (Q168A+L169Y), (Q168A + L169G), (Q168A+L169P+E245D), (Q168A+L169G+E245D) からなる群から選択され、該アミノ酸置換により熱安定性が向上した29. に記載の改変型PQQGDH。
31. 24. ~ 30. のいずれかに記載の改変型PQQGDHをコードする遺伝子。
32. 31. に記載の遺伝子を含むベクター。
33. 32. に記載のベクターで形質転換された形質転換体。
34. 33. に記載の形質転換体を培養することを特徴とする改変型PQQGDHの製造法。
35. 24. ~ 33. のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキット。
36. 24. ~ 33. のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコースセンサー。
37. 24. ~ 33. のいずれかに記載の改変型PQQGDHを含むグルコース測定方法。
38. 野生型酵素の活性型立体構造における活性中心から半径15 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1. に記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

39. 野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

40. 基質がグルコースで有る39. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

41. 野生型酵素の活性型立体構造において基質の1位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

42. 基質がグルコースである41. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

43. 野生型酵素の活性型立体構造において基質の2位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られる1. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼ。

44. 基質がグルコースで有る43. 記載の改変型グルコースデヒドロゲナーゼである。

#### 【発明の効果】

##### 【0006】

本発明による改変型PQQGDHは野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下したもの、および／または、野生型PQQGDHよりも熱安定性の向上した酵素である。本発明による改変型PQQGDHをグルコースアッセイキット及びグルコースセンサに使用することにより、野生型PQQGDHを使用したものよりもより高精度な分析が可能となったり、より安定性の高いグルコースアッセイキット及びグルコースセンサを提供することができる。

#### 【発明を実施するための最良の形態】

##### 【0007】

以下、本発明を詳細に説明する。

##### 【0008】

本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下したもの、および／または、野生型PQQGDHよりも熱安定性の向上したものである。

##### 【0009】

二糖類に対する作用性とは、二糖類を脱水素する作用を意味する。二糖類としては、マルトース、シュクロース、ラクトース、セロビオースなどが例示され、特にマルトースが例示される。本願発明では、二糖類に対する作用性が低下したことを、基質特異性の向上とも表現する。

##### 【0010】

本発明の改変型PQQGDHは、二糖類に対する作用性が野生型PQQGDHより低下していれば、グルコースに対する作用性は上昇、不変、低下のいずれであっても本発明の改変型PQQGDHに包含される。

##### 【0011】

本発明の改変型PQQGDHは、グルコース濃度の測定において二糖類に対する作用性が野生型PQQGDHを用いた場合と比較して低下したものを含む。好ましくは、マルトースに対する作用性が低下したものである。マルトースに対する作用性は、好ましくは野生型PQQGDHの90%以下、より好ましくは75%以下、さらに好ましくは60%以下、特に40%以下である。

##### 【0012】

本発明の改変型PQQGDHは、マルトースに対する作用性がグルコースに対する作用性の90%以下であるものを含む。

##### 【0013】

本発明の改変型PQQGDHは、野生型PQQGDHよりも二糖類に対するK<sub>m</sub>値が大きいものを含む。好ましくは、マルトースに対するK<sub>m</sub>値が大きいものである。マルトースに対するK<sub>m</sub>値は、好ましくは8 mM以上、より好ましくは12 mM以上、特



に20mM以上である。

【0014】

本発明の改変型PQQGDHは、二糖類に対するKm値がグルコースに対するKm値よりも大きいものを含む。好ましくは、マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値よりも大きいものである。あるいは、好ましくは、マルトースに対するKm値がグルコースに対するKm値の1.5倍以上、より好ましくは3倍以上である。

【0015】

本発明における安定性（熱安定性ともいう）は、58℃、30分間の熱処理後の活性残存率によって評価される。本発明の改変型PQQGDHは、58℃、30分間の熱処理後の活性残存率が野生型PQQGDHよりも高いものを含む。活性残存率は、好ましくは48%以上、より好ましくは55%以上、特に好ましくは70%以上である。

【0016】

野生型PQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した本発明の改変型PQQGDHとしては、例えばAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、67位、68位、69位、76位、89位、167位、168位、169位、170位、341位、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位、249位、300位、349位、129位、130位、131位及び429位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する、及び／または、428位と429位の間にアミノ酸が挿入されている、改変型PQQGDHが例示される。

【0017】

基質特異性の改良された本発明の改変型PQQGDHとしては、例えばAcinetobacter属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、アミノ酸置換を有するGDH及び428位と429位の間にアミノ酸が挿入されているGDHが例示される。

【0018】

好ましくは、Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, N167E, N167L, N167G, N167T, N167S, N167A, N167M, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169D, L169S, L169W, L169Y, L169A, L169N, L169M, L169V, L169C, L169Q, L169H, L169F, L169R, L169K, L169I, L169T, L169P, L169G, L169E, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, A170M, K89E, K300R, S207C, N188I, T349S, K300T, L174F, K49N, S189G, F215Y, S189G, E245D, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, A351T, P67K, E68K, P67D, E68T, I69C, P67R, E68R, E129R, K130G, P131G, E129N, P131T, E129Q, K130T, P131R, E129A, K130R, P131K, E341L, M342P, A343R, A343I, E341P, M342V, E341S, M342I, A343C, M342R, A343N, T349S, T349P, T349Y, N429F, N429P, N429L, N429Y, からなるA343N, L169P, L169G及びL169Eからなる群から選ばれるアミノ酸置換のうち少なくとも1つを有する、及び／または、428位と429位の間にL、AまたはKが挿入されている、改変型PQQGDHである。

【0019】

67位、68位、69位、76位、89位、167位、168位、169位、341位

、342位、343位、351位、49位、174位、188位、189位、207位、215位、245位、300位、349位、129位、130位及び131位の置換は、1ヶ所であってもよく、また複数箇所であってもよい。

## 【0020】

ここで、「Q76N」は、76位のQ (Gln) をN (Asn) に置換することを意味する。

## 【0021】

次の段落に示すいずれかの置換、及び／または、428位と429位の間へのL、AまたはKの挿入は、PQQGDHの基質特異性の向上に寄与する。

## 【0022】

Q76N, Q76E, Q76T, Q76M, Q76G, Q76K, Q168I, Q168V, Q168A, Q168C, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168K, Q168L, Q168M, Q168N, Q168R, Q168S, Q168W, L169A, L169V, L169H, L169K, L169D, L169S, L169N, L169G, L169C, A170L, A170I, A170K, A170F, A170W, A170P, E245F, E245H, E245M, E245N, E245Q, E245V, E245C, N249G, N249A, N249E, N249Q, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (K89E+K300R), (Q168A+L169D), (Q168S+L169S), (N167E+Q168G+L169T), (N167S+Q168N+L169R), (Q168G+L169T), (N167G+Q168S+L169Y), (N167L+Q168S+L169G), (N167G+Q168S+L169S+L174F+K49N), (Q168N+L168N+S189R), (N167E+Q168G+L169A+S189G), (N167G+Q168R+L169A), (N167S+Q168G+L169A), (N167G+Q168V+L169S), (N167S+Q168V+L169S), (N167T+Q168I+L169G), (N167G+Q168W+L169N), (N167G+Q168S+L169N), (N167G+Q168S+L169V), (Q168R+L169C), (N167S+Q168L+L168G), (Q168C+L169S), (N167T+Q168N+L169K), (N167G+Q168T+L169A+S207C), (N167A+Q168A+L169P), (N167G+Q168S+L169G), (N167G+Q168G), (N167G+Q168D+L169K), (Q168P+L169G), (N167G+Q168N+L169S), (Q168S+L169G), (N188I+T349S), (N167G+Q168G+L169A+F215Y), (N167G+Q168T+L169G), (Q168G+L169V), (N167G+Q168V+L169T), (N167E+Q168N+L169A), (Q168R+L169A), (N167G+Q168R), (N167G+Q168T), (N167G+Q168T+L169Q), (Q168I+L169G+K300T), (N167G+Q168A), (N167T+Q168L+L169K), (N167M+Q168Y+L169G), (N167E+Q168S), (N167G+Q168T+L169V+S189G), (N167G+Q168G+L169C), (N167G+Q168K+L169D), (Q168A+L169D), (Q168S+E245D), (Q168S+L169S), (A351T), (N167S+Q168S+L169S), (Q168I+L169Q), (N167A+Q168S+L169S), (Q168S+L169E), (Q168A+L169G), (Q168S+L169P), (P67K+E68K), (P67R+E68R+I69C), (P67D+E68T+I69C), (E129R+K130G+P131G), (E129Q+K130T+P131R), (E129N+P131T)

, (E129A+K130R+P131K), (E341L+M342P+A343R), (E341S+M342I), A343I, (E341P+M342V+A343C), (E341P+M342V+A343R), (E341L+M342R+A343N), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169I), (Q168A+L169K), (Q168A+L169M), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169S), (Q168A+L169T), (Q168A+L169V), (Q168A+L169W) 及び (Q168A+L169Y)

## 【0023】

野生型PQQGDHよりも熱安定性の向上した本発明のPQQGDHとしては、例えば *Acinetobacter* 属由来PQQGDHのアミノ酸配列において、20位、76位、89位、168位、169位、245位、246位及び300位の少なくとも1つの位置においてアミノ酸置換を有する、改変型PQQGDHが例示される。

## 【0024】

好ましくは、K20E, Q76M, Q76G, K89E, Q168A, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, L169D, L169E, L169P, L169S, Q246H, K300R, Q76N, Q76T, Q76K, L169A, L169C, L169E, L169F, L169H, L169K, L169N, L169Q, L169R, L169T, L169Y及びL169Gからなる群から選ばれるアミノ酸置換を有する。20位、76位、89位、168位、169位、246位及び300位の置換は、1ヶ所であってもよく、複数ヶ所であってもよい。

## 【0025】

ここで、「K20E」は、20位のK(Lys)をE(Glu)に置換することを意味する。

## 【0026】

次に示すいずれかのアミノ酸置換は、PQQGDHの熱安定性の向上に寄与する。

特に、K20E, Q76M, Q76G, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), Q246H, Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P, Q168W, Q168Y, Q168S, (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A+L169A), (Q168A+L169C), (Q168A+L169E), (Q168A+L169F), (Q168A+L169H), (Q168A+L169K), (Q168A+L169N), (Q168A+L169P), (Q168A+L169Q), (Q168A+L169R), (Q168A+L169T), (Q168A+L169Y), (Q168A + L169G), (Q168A+L169P+E245D), (Q168A+L169G+E245D)

## 【0027】

上記の *Acinetobacter* 属由来PQQGDHのアミノ酸配列は、好ましくは *Acinetobacter calcoaceticus* または *Acinetobacter baumannii* 由来PQQGDHのアミノ酸配列である。中でも好ましくは配列番号1である。配列番号1で示される野生型PQQGDHタンパク質及び配列番号2で示されるその塩基配列は、アシネトバクテリウム・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517株を起源とするものであり、特開平11-243949号公報に開示されている。なお、上記および配列番号1において、アミノ酸の表記は、シグナル配列が除かれたアスパラギン酸を1として番号付けされている。

## 【0028】

アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*) NCIMB11517株は、以前、*Acinetobacter calcoaceticus*に分類されていた。

## 【0029】

なお、本発明の改変型PQQGDHは、グルコースデヒドロゲナーゼ活性を有する限り、好ましくは二糖類に対する作用性及び／又は安定性に対して実質的な悪影響を及ぼさない限り、さらに他のアミノ酸残基の一部が欠失または置換されていてもよく、また他のアミノ酸残基が付加されていてもよい。

## 【0030】

ところで、本願出願時において、アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79.41株由来の酵素のX線結晶構造解析の結果が報告され、活性中心をはじめとした該酵素の高次構造が明らかとなっている（非特許文献1, 2, 3, 4を参照。）。

【非特許文献1】J. Mol. Biol., 289, 319-333 (1999)

【非特許文献2】PNAS, 96 (21), 11787-11791 (1999)

【非特許文献3】The EMBO Journal, 18 (19), 5187-5194 (1999)

【非特許文献4】Protein Science, 9, 1265-1273 (2000)

## 【0031】

その高次構造に関する知見を基に、該酵素の構造と機能の相関に関する研究が進められているが、まだ完全に明らかになったとは言えない。例えば、水溶性グルコース脱水素酵素の第6番目のWモチーフ、のBストランドとCストランドを結ぶループ領域(W6BC)中のアミノ酸残基の構造遺伝子の特定の部位に変異を導入することによりグルコースに対する選択性を改良しうることが考察されている（例えば、特許文献2を参照。）しかしながら、効果が実証されているのは実施例に開示されているものだけである。

【特許文献2】特開2001-197888

## 【0032】

一方、発明者らは、本願発明の成果をもとにこれらの高次構造に関する知見を見直したところ、二糖類に対する作用性および／または安定性の改変に、PQQの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸、グルコースの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸の少なくとも1つ以上が関わっているのではないかと考えている。

## 【0033】

本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、PQQの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸、および／または、グルコースの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されているものを含む。非特許文献3および4には、PQQに結合するアミノ酸として、Y344、W346、R228、N229、K377、R406、R408、D424、グルコースに結合するアミノ酸としては、Q76、D143、H144、D163、Q168、L169、などの記載がある。

## 【0034】

また、本発明の改変型PQQGDHは、配列番号1に記載されるPQQ依存性グルコースデヒドロゲナーゼにおいて、カルシウムイオンの結合に関与するアミノ酸及び／またはその周辺のアミノ酸が置換されているものを含む。非特許文献1には、活性中心のカルシウムイオンに結合するアミノ酸としては、P248、G247、Q246、D252、T348などの記載がある。

## 【0035】

また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造における活性中心

から半径15 Å以内、好ましくは半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。

【0036】

また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。

【0037】

また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質の1位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。

【0038】

また、本発明の改変型PQQGDHは、野生型酵素の活性型立体構造において基質の2位の炭素に結合するOH基から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものを含む。特に、基質がグルコースであるとき、野生型酵素の活性型立体構造において基質から半径10 Å以内の範囲に位置するアミノ酸を変異することにより得られるものが好ましい。

【0039】

以上の教示にしたがって、当業者は、他の起源に由来する改変型PQQGDHについても、当該領域でアミノ酸残基を置換することにより、野生型のPQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した、及び／又は、安定性が向上した改変型PQQGDHを得ることができる。

【0040】

例えば、配列番号1のアミノ酸配列と、アシネトバクター・カルコアセティカス (*Acinetobacter calcoaceticus*) LMD79. 41株由来酵素のアミノ酸配列を比較すると、相違箇所はわずかで、相同性は92.3% (シグナル配列含む) となり、非常に類似しているので、配列番号1におけるある残基が、他起源の酵素のどのアミノ酸残基に該当するかを容易に認識することができる。そして、本発明にしたがって、そのような1またはそれ以上の箇所においてアミノ酸残基を他のアミノ酸残基で欠失、置換あるいは挿入等することにより、野生型のPQQGDHよりも二糖類に対する作用性が低下した、及び／又は、安定性が向上した改変型PQQGDHを得ることができる。これらの改変型PQQGDHグルコース脱水素酵素も本発明の範囲内に含まれる。

【0041】

本発明の改変型PQQGDHをコードする遺伝子は、微生物など種々の起源より得られる野生型PQQGDHをコードする遺伝子を含むDNA断片を改変することにより得られる可能性がある。具体的には、例えばアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ (*Acinetobacter baumannii*)、シュードモナス・エルギノサ (*Pseudomonas aeruginosa*)、シュードモナス・プチダ (*Pseudomonas putida*)、シュードモナス・フルオレッセン (*Pseudomonas fluorescens*)、グルコノバクター・オキシダンス等の酸化細菌やアグロバクテリウム・ラジオバクター (*Agrobacterium radiobacter*)、エシェリヒア・コリ、クレブシーラ・エーロジーンズ (*Klebsiella aerogenes*) 等の腸内細菌を挙げることができる。ただし、エシェリヒア・コリなどに存在する膜型酵素を改変して可溶型にすることは困難であり、起源としてはアシネトバクター・カルコアセティカスもしくはアシネトバクター・バウマンニなどの可溶性PQQGDHを選択することが好ましい。

【0042】

野生型PQQGDHをコードする遺伝子を改変する方法としては、通常行われる遺伝情

報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製, EXOIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など) の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) の利用が挙げられる。

#### 【0043】

作製された改変タンパク質の遺伝情報を有するDNAは、プラスミドと連結された状態にて宿主微生物中に移入され、改変タンパク質を生産する形質転換体となる。この際のプラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリ (Escherichia coli) を宿主微生物とする場合には pBluescript, pUC18 などが使用できる。宿主微生物としては、例えば、エシェリヒア・コリ W3110、エシェリヒア・コリ C600、エシェリヒア・コリ JM109、エシェリヒア・コリ DH5 $\alpha$  などが利用できる。宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア属に属する微生物の場合には、カルシウムイオンの存在下で組換えDNAの移入を行なう方法などを採用することができ、更にエレクトロポレーション法を用いても良い。更には、市販のコンピテントセル (例えば、コンピテントハイ JM109; 東洋紡績製) を用いても良い。

#### 【0044】

このような遺伝子はこれらの菌株より抽出してもよく、また化学的に合成することもできる。さらに、PCR法の利用により、PQQGDH遺伝子を含むDNA断片を得ることも可能である。

#### 【0045】

本発明において、PQQGDHをコードする遺伝子を得る方法としては、次のような方法が挙げられる。例えばアシネトバクター・カルコアセティカス NCIB11517 の染色体を分離、精製した後、超音波処理、制限酵素処理等を用いてDNAを切断したものと、リニアな発現ベクターと両DNAの平滑末端または付着末端においてDNAリガーゼなどにより結合閉鎖させて組換えベクターを構築する。該組換えベクターを複製可能な宿主微生物に移入した後、ベクターのマーカと酵素活性の発現を指標としてスクリーニングして、PQQを補欠分子族とするGDHをコードする遺伝子を含む組換えベクターを保持する微生物を得る。

#### 【0046】

次いで、上記組換えベクターを保持する微生物を培養して、該培養微生物の菌体から該組換えベクターを分離、精製し、該発現ベクターからGDHをコードする遺伝子を取り出すことができる。例えば、遺伝子供与体であるアシネトバクター・カルコアセティカス NCIB11517 の染色体DNAは、具体的には以下のようにして採取される。

#### 【0047】

該遺伝子供与微生物を例えば1～3日間攪拌培養して得られた培養液を遠心分離により集菌し、次いで、これを溶菌させることによりPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子の含有溶菌物を調製することができる。溶菌の方法としては、例えばリゾチーム等の溶菌酵素により処理が施され、必要に応じてプロテアーゼや他の酵素やラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 等の界面活性剤が併用される。さらに、凍結融解やフレンチプレス処理のような物理的破碎方法と組み合わせてもよい。

#### 【0048】

上記のようにして得られた溶菌物からDNAを分離精製するには、常法に従って、例えばフェノール処理やプロテアーゼ処理による除蛋白処理や、リボヌクレアーゼ処理、アルコール沈殿処理などの方法を適宜組み合わせることにより行うことができる。

#### 【0049】

微生物から分離、精製されたDNAを切断する方法は、例えば超音波処理、制限酵素処理などにより行うことができる。好ましくは特定のヌクレオチド配列に作用するII型制限酵素が適している。

#### 【0050】

クローニングする際のベクターとしては、宿主微生物内で自律的に増殖し得るファージまたはプラスミドから遺伝子組換え用として構築されたものが適している。ファージとしては、例えばエシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合にはLambda gt10、Lambda gt11などが例示される。また、プラスミドとしては、例えば、エシェリヒア・コリを宿主微生物とする場合には、pBR322、pUC19、pBluescriptなどが例示される。

#### 【0051】

クローニングの際、上記のようなベクターを、上述したGDHをコードする遺伝子供与体である微生物DNAの切断に使用した制限酵素で切断してベクター断片を得ることができるが、必ずしも該微生物DNAの切断に使用した制限酵素と同一の制限酵素を用いる必要はない。微生物DNA断片とベクターDNA断片とを結合させる方法は、公知のDNAリガーゼを用いる方法であればよく、例えば微生物DNA断片の付着末端とベクター断片の付着末端とのアニーリングの後、適当なDNAリガーゼの使用により微生物DNA断片とベクターDNA断片との組換えベクターを作成する。必要に応じて、アニーリングの後、宿主微生物に移入して生体内のDNAリガーゼを利用し組換えベクターを作製することもできる。

#### 【0052】

クローニングに使用する宿主微生物としては、組換えベクターが安定であり、かつ自律増殖可能で外来性遺伝子の形質発現できるものであれば特に制限されない。一般的には、エシェリヒア・コリW3110、エシェリヒア・コリC600、エシェリヒア・コリHB101、エシェリヒア・コリJM109、エシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ などを用いることができる。

#### 【0053】

宿主微生物に組換えベクターを移入する方法としては、例えば宿主微生物がエシェリヒア・コリの場合には、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

#### 【0054】

上記のように得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量のGDHを安定に生産し得る。宿主微生物への目的組換えベクターの移入の有無についての選択は、目的とするDNAを保持するベクターの薬剤耐性マーカーとPQQの添加によりGDH活性を同時に発現する微生物を検索すればよい。例えば、薬剤耐性マーカーに基づく選択培地で生育し、かつGDHを生成する微生物を選択すればよい。

#### 【0055】

上記の方法により得られたPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子の塩基配列は、Science, 第214巻, 1205 (1981)に記載されたジデオキシ法により解読した。また、GDHのアミノ酸配列は上記のように決定された塩基配列より推定した。

#### 【0056】

上記のようにして、一度選択されたPQQを補欠分子族とするGDH遺伝子を保有する組換えベクターより、PQQ生産能を有する微生物にて複製できる組換えベクターへの移入は、GDH遺伝子を保持する組換えベクターから制限酵素やPCR法によりGDH遺伝子であるDNAを回収し、他のベクター断片と結合させることにより容易に実施できる。また、これらのベクターによるPQQ生産能を有する微生物の形質転換は、カルシウム処理によるコンピテントセル法やエレクトロポレーション法などを用いることができる。

#### 【0057】

PQQ生産能を有する微生物としては、メチロバクテリウム (Methylobacterium) 属等のメタノール資化性細菌、アセトバクター (Acetobacter

) 属やグルコノバクター (*Glucanobacter*) 属の酢酸菌、フラボバクテリウム (*Flavobacterium*) 属、シュードモナス属、アシネトバクター属等の細菌を挙げることができる。なかでも、シュードモナス属細菌とアシネトバクター属細菌が利用できる宿主-ベクター系が確立されており利用しやすいので好ましい。

#### 【0058】

シュードモナス属細菌では、シュードモナス・エルギノサ、シュードモナス・フルオレッセンス、シュードモナス・プチダなどを用いることができる。また、アシネトバクター属細菌ではアシネトバクター・カルコアセティカス、アシネトバクター・バウマンニ等を用いることができる。

#### 【0059】

上記微生物にて複製できる組換えベクターとしては、RSF1010 由来のベクターもしくはとその類似のレプリコンを有するベクターがシュードモナス属細菌に利用可能である。例えば、pKT240、pMMB24等 (M. M. Bagdasarian ら, Gene, 26, 273 (1983))、pCN40、pCN60等 (C. C. Nieto ら, Gene, 87, 145 (1990)) や pTS1137 等を挙げることができる。また、pME290等 (Y. Itoh ら, Gene, 36, 27 (1985))、pNI111、pNI20C (N. Itoh ら, J. Biochem., 110, 614 (1991)) も利用できる。

#### 【0060】

アシネトバクター属細菌では、pWM43 等 (W. Minas ら, Appl. Environ. Microbiol., 59, 2807 (1993))、pKT230、pWH1266 等 (M. Hunger ら, Gene, 87, 45 (1990)) がベクターとして利用可能である。

#### 【0061】

こうして得られた形質転換体である微生物は、栄養培地で培養されることにより、多量の改変タンパク質を安定して生産し得る。形質転換体である宿主微生物の培養形態は、宿主の栄養生理的性質を考慮して培養条件を選択すればよく、多くの場合は液体培養で行う。工業的には通気攪拌培養を行うのが有利である。

#### 【0062】

培地の栄養源としては、微生物の培養に通常用いられるものが広く使用され得る。炭素源としては資化可能な炭素化合物であればよく、例えば、グルコース、シュークロース、ラクトース、マルトース、ラクトース、糖蜜、ピルビン酸などが使用される。また、窒素源としては利用可能な窒素化合物であればよく、例えば、ペプトン、肉エキス、酵母エキス、カゼイン加水分解物、大豆粕アルカリ抽出物などが使用される。その他、リン酸塩、炭酸塩、硫酸塩、マグネシウム、カルシウム、カリウム、鉄、マンガン、亜鉛などの塩類、特定のアミノ酸、特定のビタミンなどが必要に応じて使用される。

#### 【0063】

培養温度は菌が成育し、改変型PQQGDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、上記のようなPQQ生産能を有する微生物の場合、好ましくは20~42℃程度である。培養時間は条件によって多少異なるが、改変型PQQGDHが最高収量に達する時期を見計らって適当時期に培養を完了すればよく、通常は6~48時間程度である。培地のpHは菌が発育し、改変型PQQGDHを生産する範囲で適宜変更し得るが、好ましくはpH6.0~9.0程度の範囲である。

#### 【0064】

培養物中の改変型PQQGDHを生産する菌体を含む培養液をそのまま採取し、利用することもできるが、一般には、常法に従って、改変型PQQGDHが培養液中に存在する場合はろ過、遠心分離などにより、改変型PQQGDH含有溶液と微生物菌体とを分離した後に利用される。改変型PQQGDHが菌体内に存在する場合には、得られた培養物からろ過または遠心分離などの手段により菌体を採取し、次いで、この菌体を機械的方法またはリゾチームなどの酵素的方法で破壊し、また、必要に応じて、EDTA等のキレート



剤及び界面活性剤を添加してGDHを可溶化し、水溶液として分離採取する。

#### 【0065】

上記のようにして得られたGDH含有溶液を、例えば減圧濃縮、膜濃縮、さらに硫酸アンモニウム、硫酸ナトリウムなどの塩析処理、あるいは親水性有機溶媒、例えばメタノール、エタノール、アセトンなどによる分別沈殿法により沈殿せしめればよい。また、加熱処理や等電点処理も有効な精製手段である。その後、吸着剤あるいはゲルろ過剤などによるゲルろ過、吸着クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、アフィニティクロマトグラフィーを行うことにより、精製されたGDHを得ることができる。

#### 【0066】

例えば、セファデックス (Sephadex) ゲル (ファルマシアバイオテク) などによるゲルろ過、DEAEセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク)、オクチルセファロースCL-6B (ファルマシアバイオテク) 等のカラムクロマトグラフィーにより分離、精製し、精製酵素標品を得ることができる。該精製酵素標品は、電気泳動 (SDS-PAGE) 的に単一のバンドを示す程度に純化されていることが好ましい。

#### 【0067】

上記のようにして得られた精製酵素を、例えば凍結乾燥、真空乾燥やスプレードライなどにより粉末化して流通させることが可能である。その際、精製酵素はリン酸緩衝液、トリス塩酸緩衝液やGOODの緩衝液に溶解しているものを用いることができる。好適なものはGOODの緩衝液であり、なかでも、PIPES、MESもしくはMOPS緩衝液が特に好ましい。また、カルシウムイオンまたはその塩、およびグルタミン酸、グルタミン、リジン等のアミノ酸類、さらに血清アルブミン等を添加することによりGDHをより安定化することができる。

#### 【0068】

本発明の改変タンパク質の製造方法は、特に限定されないが、以下に示すような手順で製造することが可能である。タンパク質を構成するアミノ酸配列を改変する方法としては、通常行われる遺伝情報を改変する手法が用いられる。すなわち、タンパク質の遺伝情報を有するDNAの特定の塩基を変換することにより、或いは特定の塩基を挿入または欠失させることにより、改変蛋白質の遺伝情報を有するDNAが作成される。DNA中の塩基を変換する具体的な方法としては、例えば市販のキット (Transformer Mutagenesis Kit; Clontech製, EXOIII/Mung Bean Deletion Kit; Stratagene製, QuickChange Site Directed Mutagenesis Kit; Stratagene製など) の使用、或いはポリメラーゼ連鎖反応法 (PCR) の利用が挙げられる。

#### 【0069】

本発明では、配列番号1に示されるPQQGDHの76位、167位、168位、169位、170位および245位に着目し、そのアミノ酸置換体を作成したところ、基質特異性が改善されたPQQGDH改変体を得ることができた。基質特異性に関しては、Q76K, Q168A, A170P, E245D, (Q168A+L169G+E245D), (Q168A+L169P+E245D), (Q168S + L169S), (Q168A + L169D), (Q168S + E245D), (Q168S + L169E), (Q168A + L169G), (Q168S + L169P), (Q168A + L169A), (Q168A + L169C), (Q168A + L169E), (Q168A + L169K), (Q168A + L169M), (Q168A + L169N), (Q168A + L169P), (Q168A + L169S) および (Q168A + L169T) が特に好ましい。

#### 【0070】

本発明では、配列番号1に示されるPQQGDHの20位、76位、89位、168位、169位、245位、246位及び300位に着目し、そのアミノ酸置換体を作成したところ、安定性が改善されたPQQGDH改変体を得ることができた。熱安定性に関する

限り、K20E, (K89E + K300R), Q168A, (Q168A + L169D), (Q168S + L169S), (Q168S + L169E), (Q168S + L169P), (Q168A + L169G), Q168D, Q168E, Q168F, Q168G, Q168H, Q168M, Q168P,

Q168S, Q168W, Q168Y, (Q168A + L169A), (Q168A + L169C), (Q168A + L169E), (Q168A + L169F), (Q168A + L169H), (Q168A + L169K), (Q168A + L169N), (Q168A + L169P), (Q168A + L169Q), (Q168A + L169R), (Q168A + L169T), (Q168A + L169Y), (Q168A + L169G + E245D), (Q168A + L169P + E245D) 及びQ246Hの置換が特に望ましい。

#### 【0071】

改変タンパク質は、液状（水溶液、懸濁液等）、粉末、凍結乾燥など種々の形態をとることができる。凍結乾燥法としては、特に制限されるものではなく常法に従って行えばよい。本発明の酵素を含む組成物は凍結乾燥物に限られず、凍結乾燥物を再溶解した溶液状態であってもよい。また、グルコース測定を行なう際には、グルコースアッセイキット、グルコースセンサーなどの種々の形態をとることができる。この様にして得られた精製された改変タンパク質は、以下のような方法により安定化することができる。

#### 【0072】

精製された改変タンパク質に（1）アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、 $\alpha$ -ケトグルコン酸、 $\alpha$ -サイクロデキストリンおよびそれらの塩からなる群から選ばれた1種または2種以上の化合物および（2）アルブミンを共存せしめることにより、改変タンパク質をさらに安定化することができる。

#### 【0073】

凍結乾燥組成物中においては、PQQGDH含有量は、酵素の起源によっても異なるが、通常は約5～50%（重量比）の範囲で好適に用いられる。酵素活性に換算すると、100～2000U/mgの範囲で好適に用いられる。

#### 【0074】

アスパラギン酸、グルタミン酸、 $\alpha$ -ケトグルタル酸、リンゴ酸、及び $\alpha$ -ケトグルコン酸の塩としては、ナトリウム、カリウム、アンモニウム、カルシウム、及びマグネシウム等の塩が挙げられるが特に限定されるものではない。上記化合物とその塩及び $\alpha$ -サイクロデキストリンの添加量は、1～90%（重量比）の範囲で添加することが好ましい。これらの物質は単独で用いてもよいし、複数組み合わせてもよい。

#### 【0075】

含有される緩衝液としては特に限定されるものではないが、トリス緩衝液、リン酸緩衝液、ホウ酸緩衝液、GOOD緩衝液などが挙げられる。該緩衝液のpHは5.0～9.0程度の範囲で使用目的に応じて調整される。凍結乾燥物中においては緩衝剤の含有量は、特に限定されるものではないが、好ましくは0.1%（重量比）以上、特に好ましくは0.1～30%（重量比）の範囲で使用される。

#### 【0076】

使用できるアルブミンとしては、牛血清アルブミン（BSA）、卵白アルブミン（OVA）などが挙げられる。特にBSAが好ましい。該アルブミンの含有量は、好ましくは1～80%（重量比）、より好ましくは5～70%（重量比）の範囲で使用される。

#### 【0077】

組成物には、さらに他の安定化剤などをPQQGDHの反応に特に悪い影響を及ぼさないような範囲で添加してもよい。本発明の安定化剤の配合法は特に制限されるものではない。例えばPQQGDHを含む緩衝液に安定化剤を配合する方法、安定化剤を含む緩衝液にPQQGDHを配合する方法、あるいはPQQGDHと安定化剤を緩衝液に同時に配合

する方法などが挙げられる。

【0078】

また、カルシウムイオンを添加しても安定化効果が得られる。すなわち、カルシウムイオンまたはカルシウム塩を含有させることにより、改変タンパク質を安定化させることができる。カルシウム塩としては、塩化カルシウムまたは酢酸カルシウムもしくはクエン酸カルシウム等の無機酸または有機酸のカルシウム塩などが例示される。また、水性組成物において、カルシウムイオンの含有量は、 $1 \times 10^{-4} \sim 1 \times 10^{-2} \text{ M}$ であることが好ましい。

【0079】

カルシウムイオンまたはカルシウム塩を含有させることによる安定化効果は、グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸を含有させることにより、さらに向上する。

【0080】

グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されるアミノ酸は、1種または2種以上であってもよい。前記の水性組成物において、グルタミン酸、グルタミンおよびリジンからなる群から選択されたアミノ酸の含有量は、0.01～0.2重量%であることが好ましい。

【0081】

さらに血清アルブミンを含有させてもよい。前記の水性組成物に血清アルブミンを添加する場合、その含有量は0.05～0.5重量%であることが好ましい。

【0082】

緩衝剤としては、通常のもので使用され、通常、組成物のpHを5～10とするものが好ましい。具体的にはトリス塩酸、ホウ酸、グッド緩衝液が用いられるが、カルシウムと不溶性の塩を形成しない緩衝液はすべて使用できる。

【0083】

前記の水性組成物には、必要により他の成分、例えば界面活性剤、安定化剤、賦形剤などを添加しても良い。

【0084】

本発明においては以下の種々の方法によりグルコースを測定することができる。

グルコースアッセイキット

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを含むグルコースアッセイキットを特徴とする。本発明のグルコースアッセイキットは、本発明に従う改変型PQQGDHを少なくとも1回のアッセイに十分な量で含む。典型的には、キットは、本発明の改変型PQQGDHに加えて、アッセイに必要な緩衝液、メディエーター、キャリブレーションカーブ作製のためのグルコース標準溶液、ならびに使用の指針を含む。本発明に従う改変型PQQGDHは種々の形態で、例えば、凍結乾燥された試薬として、または適切な保存溶液中の溶液として提供することができる。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で提供されるが、アポ酵素の形態で提供し、使用時にホロ化することもできる。

【0085】

グルコースセンサー

本発明はまた、本発明に従う改変型PQQGDHを用いるグルコースセンサーを特徴とする。電極としては、カーボン電極、金電極、白金電極などを用い、この電極上に本発明の酵素を固定化する。固定化方法としては、架橋試薬を用いる方法、高分子マトリックス中に封入する方法、透析膜で被覆する方法、光架橋性ポリマー、導電性ポリマー、酸化還元ポリマーなどがあり、あるいはフェロセンあるいはその誘導体に代表される電子メディエーターとともにポリマー中に固定あるいは電極上に吸着固定してもよく、またこれらを組み合わせて用いてもよい。好ましくは本発明の改変型PQQGDHはホロ化した形態で電極上に固定化するが、アポ酵素の形態で固定化し、PQQを別の層としてまたは溶液中で提供することもできる。典型的には、グルタルアルデヒドを用いて本発明の改変型PQQGDHをカーボン電極上に固定化した後、アミン基を有する試薬で処理してグルタルア

ルデヒドをブロッキングする。

【0086】

グルコース濃度の測定は、以下のようにして行うことができる。恒温セルに緩衝液を入れ、PQQおよびCaCl<sub>2</sub>、およびメディエーターを加えて一定温度に維持する。メディエーターとしては、フェリシアン化カリウム、フェナジンメトサルフェートなどを用いることができる。作用電極として本発明の改変型PQQGDHを固定化した電極を用い、対極（例えば白金電極）および参照電極（例えばAg/AgCl電極）を用いる。カーボン電極に一定の電圧を印加して、電流が定常になった後、グルコースを含む試料を加えて電流の増加を測定する。標準濃度のグルコース溶液により作製したキャリブレーションカーブに従い、試料中のグルコース濃度を計算することができる。

【実施例】

【0087】

以下、本発明を実施例に基づきより詳細に説明する。

実施例1：PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子の発現プラスミドの構築

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の発現プラスミドpNPG5は、ベクターpBluescript SK(−)のマルチクローニング部位にアシネトバクター・バウマンニ(Acinetobacter baumannii) NCIMB11517株由来のPQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする構造遺伝子を挿入したものである。その塩基配列を配列表の配列番号2に、また該塩基配列から推定されるPQQ依存性グルコース脱水素酵素のアミノ酸配列を配列表の配列番号1に示す。

【0088】

実施例2：変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の作製

野生型PQQ依存性グルコース脱水素酵素遺伝子を含む組換えプラスミドpNPG5と配列番号3記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、QuickChange<sup>TM</sup> Site-Directed Mutagenesis Kit (STRATAGENE製)を用いて、そのプロトコルに従って変異処理操作を行い、更に塩基配列を決定して、配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがアスパラギンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M1)を取得した。

pNPG5と配列番号4記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M2)を取得した。

pNPG5と配列番号5記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがスレオニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M3)を取得した。

pNPG5と配列番号6記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがメチオニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M4)を取得した。

pNPG5と配列番号7記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがグリシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M5)を取得した。

pNPG5と配列番号8記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の76番目のグルタミンがリジンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M6)取得した。

pNPG5と配列番号9記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴ

ヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがイソロイシンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M7)を取得した。

pNPG5と配列番号10記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがバリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M8)を取得した。

pNPG5と配列番号11記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M9)を取得した。

pNPG5と配列番号22記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の20番目のリジンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M10)を取得した。

pNPG5と配列番号23記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミドを取得した。更にこのプラスミドと配列番号24記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の89番目のリジンがグルタミン酸に、300番目のリジンがアルギニンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M11)を取得した。

pNPG5と配列番号25記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の246番目のグルタミンがヒスチジンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M12)を取得した。

pNPG5と配列番号26記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがセリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M13)を取得した。

pNPG5と配列番号27記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがアスパラギン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M14)を取得した。

pNPG5と配列番号66記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがグルタミン酸に置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M15)を取得した。

pNPG5と配列番号67記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがセリンに、169番目のロイシンがプロリンに置換された変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M16)を取得した。

pNPG5と配列番号68記載の合成オリゴヌクレオチド及びこれと相補的な合成オリゴヌクレオチドを基に、上記方法と同様にして配列番号2記載のアミノ酸配列の168番目のグルタミンがアラニンに、169番目のロイシンがグリシンに置換された変異型PQQ

Q依存性グルコース脱水素酵素をコードする組換えプラスミド(pNPG5M17)を取得した。

pNPG5、pNPG5M1、pNPG5M2、pNPG5M3、pNPG5M4、pNPG5M5、pNPG5M6、pNPG5M7、pNPG5M8、pNPG5M9、pNPG5M10、pNPG5M11、pNPG5M12、pNPG5M13、pNPG5M14、pNPG5M15、pNPG5M16、pNPG5M17の各組換えプラスミドで大腸菌コンピテントセル(エシェリヒア・コリーJM109; 東洋紡績製)を形質転換し、該形質転換体をそれぞれ取得した。

#### 【0089】

実施例3: シュードモナス属細菌で複製できる発現ベクターの構築

実施例2で得た組換えプラスミドpNPG5M1のDNA 5  $\mu$ gを制限酵素BamHIおよびXhoI(東洋紡績製)で切断して、変異型PQQ依存性グルコース脱水素酵素の構造遺伝子部分を単離した。単離したDNAとBamHIおよびXhoIで切断したpTM33(1  $\mu$ g)とをT4DNAリガーゼ1単位で16℃、16時間反応させ、DNAを連結した。連結したDNAはエシェリヒア・コリDH5 $\alpha$ のコンピテントセルを用いて形質転換を行った。得られた発現プラスミドをpNPG6M1と命名した。

pNPG5、pNPG5M2、pNPG5M3、pNPG5M4、pNPG5M5、pNPG5M6、pNPG5M7、pNPG5M8、pNPG5M9、pNPG5M10、pNPG5M11、pNPG5M12、pNPG5M13、pNPG5M14、pNPG5M15、pNPG5M16、pNPG5M17の各組換えプラスミドについても上記方法と同様にして発現プラスミドを取得した。得られた発現プラスミドそれぞれpNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17と命名した。

#### 【0090】

実施例4: シュードモナス属細菌の形質転換体の作製

シュードモナス・プチダTE3493(微工研寄12298号)をLBG培地(LB培地+0.3%グリセロール)で30℃、16時間培養し、遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュウクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)8mlを加え、菌体を懸濁した。再度遠心分離(12,000rpm、10分間)により菌体を回収し、この菌体に氷冷した300mMシュウクロースを含む5mMK-リン酸緩衝液(pH7.0)0.4mlを加え、菌体を懸濁した。

該懸濁液に実施例3で得た発現プラスミドpNPG6M1を0.5  $\mu$ g加え、エレクトロポレーション法により形質転換した。100  $\mu$ g/mlのストレプトマイシンを含むLB寒天培地に生育したコロニーより、目的とする形質転換体を得た。

pNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17の各発現プラスミドについても上記方法と同様にして、該形質転換体をそれぞれ取得した。

#### 【0091】

試験例1

GDH活性の測定方法

測定原理

D-グルコース + PMS + PQQGDH  $\rightarrow$  D-グルコノ-1,5-ラクトン + PMS (red)

2 PMS (red) + NTB  $\rightarrow$  2 PMS + ジホルマザン

フェナジンメトサルフェート(PMS) (red) によるニトロテトラゾリウムブルー (

NTB) の還元により形成されたジホルマザンの存在は、570 nm で分光光度法により測定した。

#### 単位の定義

1 単位は、以下に記載の条件下で 1 分当たりジホルマザンを 0.5 ミリモル形成させる PQQGDH の酵素量をいう。

#### (3) 方法

##### 試薬

A. D-グルコース溶液: 0.5 M (0.9 g D-グルコース (分子量 180.16) / 10 ml H<sub>2</sub>O)

B. PIPES-NaOH 緩衝液, pH 6.5: 50 mM (60 mL の水中に懸濁した 1.51 g の PIPES (分子量 302.36) を、5 N NaOH に溶解し、2.2 mL の 10% Triton X-100 を加える。5 N NaOH を用いて 25℃ で pH を 6.5 ± 0.05 に調整し、水を加えて 100 mL とした。)

C. PMS 溶液: 3.0 mM (9.19 mg のフェナジンメトサルフェート (分子量 817.65) / 10 mL H<sub>2</sub>O)

D. NTB 溶液: 6.6 mM (53.96 mg のニトロテトラゾリウムブルー (分子量 817.65) / 10 mL H<sub>2</sub>O)

E. 酵素希釈液: 1 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.1% Triton X-100, 0.1% BSA を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 6.5)

##### 手順

遮光ビンに以下の反応混合物を調製し、氷上で貯蔵した (用時調製)

- |         |                         |     |
|---------|-------------------------|-----|
| 1. 8 ml | D-グルコース溶液               | (A) |
| 24.6 ml | PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 6.5) | (B) |
| 2.0 ml  | PMS 溶液                  | (C) |
| 1.0 ml  | NTB 溶液                  | (D) |

【0092】

【表 1】

アッセイ混合物中の濃度	
PIPES 緩衝液	42 mM
D-グルコース	30 mM
PMS	0.20 mM
NTB	0.22 mM

【0093】

3.0 mL の反応混合液を試験管 (プラスチック製) に入れ、37℃ で 5 分間予備加温した。

0.1 mL の酵素溶液を加え、穏やかに反転して混合した。

570 nm での水に対する吸光度の増加を 37℃ に維持しながら分光光度計で 4 ~ 5 分間記録し、曲線の初期直線部分からの 1 分当たりの ΔOD を計算した (OD テスト)。

同時に、酵素溶液に代えて酵素希釈液 (E) を加えることを除いては同一の方法を繰り返して、ブランク (ΔOD ブランク) を測定した。

アッセイの直前に氷冷した酵素希釈液 (E) で酵素粉末を溶解し、同一の緩衝液で 0.1 ~ 0.8 U/mL に希釈した (該酵素の接着性のためにプラスチックチューブの使用が好ましい)。

## 計算

活性を以下の式を用いて計算する:

$$U/ml = \{ \Delta OD / min (\Delta OD \text{テスト} - \Delta OD \text{ブランク}) \times V_t \times df \} / (2.0 \times 1.0 \times V_s)$$

$$U/mg = (U/ml) \times 1 / C$$

$V_t$ : 総体積 (3.1 ml)

$V_s$ : サンプル体積 (1.0 ml)

2.0: ジホルマザンの1/2ミリモル分子吸光係数

1.0: 光路長 (cm)

$df$ : 希釈係数

$C$ : 溶液中の酵素濃度 (c mg/ml)

【0094】

## ホロ型発現精製酵素の調製方法

500 mlのTerrific brothを2 L容坂口フラスコに分注し、121℃、20分間オートクレーブを行い、放冷後別途無菌濾過したストレプトマイシンを100 μg/mlになるように添加した。この培地に100 μg/mlのストレプトマイシンを含むPY培地で予め30℃、24時間培養したシュドモナス・プチダTE3493 (pNPG6M1)の培養液を5 ml接種し、30℃で40時間通気攪拌培養した。培養終了時のPQQ依存性グルコース脱水素酵素活性は、前記活性測定において、培養液1 ml当たり約120 U/mlであった。

上記菌体を遠心分離により集菌し、20 mMリン酸緩衝液 (pH 7.0) に懸濁した後、超音波処理により破碎し、更に遠心分離を行い、上清液を粗酵素液として得た。得られた粗酵素液をHiTrap-SP (アマシャム・ファルマシア) イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製した。次いで10 mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH 6.5) で透析した後に終濃度が1 mMになるように塩化カルシウムを添加した。最後にHiTrap-DEAE (アマシャム・ファルマシア) イオン交換カラムクロマトグラフィーにより分離・精製し、精製酵素標品を得た。本方法により得られた標品は、SDS-PAGE的にほぼ単一なバンドを示した。

pNPG6、pNPG6M2、pNPG6M3、pNPG6M4、pNPG6M5、pNPG6M6、pNPG6M7、pNPG6M8、pNPG6M9、pNPG6M10、pNPG6M11、pNPG6M12、pNPG6M13、pNPG6M14、pNPG6M15、pNPG6M16、pNPG6M17によるシュドモナス・プチダTE3493形質転換体についても上記方法と同様にして精製酵素標品を取得した。

このようにして取得した精製酵素を用いて性能を評価した。

【0095】

## Km値の測定

上記の活性測定方法に従い、PQQGDHの活性を測定した。グルコースに対するKm値の測定は、上記活性測定方法の基質濃度を変化させて実施した。また、マルトースに対するKm値の測定は、上記活性測定方法のグルコース溶液をマルトース溶液に置き換え、グルコースに対するKm値の測定同様基質濃度を変化させて実施した。結果を表2 A表2 B、表6、表9、表14及び表18に示す。

【0096】

## 基質特異性

上記の活性測定方法に従い、PQQGDHの活性を測定した。グルコースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値とマルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性値を測定し、グルコースを基質とした場合の測定値を100とした場合の相対値を求めた。マルトースを基質溶液とした場合の脱水素酵素活性に際しては、0.5 Mのマルトース溶液を調製して活性測定に用いた。結果を表2 A、表2 B、表4、表5、表6、表8、表9、表11、表13、表14及び表18に示す。

【0097】



## 熱安定性の測定

各種 PQQGDH を酵素濃度 5 U/ml、緩衝液 (1 mM  $\text{CaCl}_2$ 、1  $\mu\text{M}$  PQQ を含む 10 mM PIPES-NaOH (pH 6.5) 中で保存し、58℃で熱処理後の活性残存率を求めた。結果を表 2A、表 2B、表 6、表 9、表 14 及び表 18 に示す。なお、熱処理を行なった時間は、表 2B、表 18 の試験のみ 30 分間、その他の試験は 20 分間である。

【0098】

## 至適 pH の測定

0.22% Triton-X100 を含む 50 mM リン酸緩衝液 (pH 5.0~8.0)、0.22% Triton-X100 を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.0~6.0)、0.22% Triton-X100 を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0~7.0)、0.22% Triton-X100 を含む 50 mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0~9.0) 中で酵素活性を測定した。結果を図 1 に示す。また、最も高い活性を示した pH を表 2A に示す。

【0099】

【表 2】

A

変異	比活性	基質 特異性	K <sub>m</sub> (Mal)	K <sub>m</sub> (Glc)	至適 pH	熱安定性
Q76N	49	66%	13.6	3.1	6.4	49.1%
Q76E	36	68%	13.6	3.7	5.6	42.5%
Q76T	32	84%	10.3	2.5	6.4	49.0%
Q76M	108	81%	8.7	2.2	6.4	55.3%
Q76G	32	84%	10.6	2.2	6.4	58.5%
Q76K	84	32%	29.9	7.9	6.8	48.4%
Q168I	231	69%	11.9	5.3	6.8	27.3%
Q168V	377	71%	13.0	6.4	6.4	32.2%
Q168A	333	37%	35.3	10.4	6.4	59.2%
野生型	1469	103%	4.1	6.5	6.4	46.7%

注) 比活性: 酵素活性 (U/mL) / A280nm の吸光度 (ABS)

K<sub>m</sub> (Mal): マルトースに対する K<sub>m</sub> 値 (mM)K<sub>m</sub> (Glc): グルコースに対する K<sub>m</sub> 値 (mM)

B

変異	比活性	基質特異性	熱安定性
K20E	924	105%	49.7%
Q76M	108	81%	52.3%
Q76G	32	84%	55.1%
K89E + K300R	1038	81%	58.8%
Q168A	333	37%	55.8%
Q246H	686	192%	82.2%
Q168S+L169S	288	33%	73.0%
Q168A+L169D	106	18%	78.8%
Q168S+L169E	270	19%	47.0%
Q168S+L169P	460	25%	47.2%
Q168A+L169G	170	18%	78.3%
野生型	1469	103%	43.4%

注) 比活性: 酵素活性 / A280nm の吸光度

【0100】

Q76Kのグルコース定量性の確認

0.45 U/mLのQ76Kを含んだ下記反応試薬を調整した。

50 mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH 6.5)

1 mM  $\text{CaCl}_2$

0.22% Triton-X100

0.4 mM PMS

0.26 mM WST-1 (水溶性テトラゾリウム塩、同仁化学研究所製)

下記に示すグルコース量の測定方法に従い、試料として精製水、100 mg/dl 標準液及びグルコース水溶液 (600 mg/dl) の10水準の希釈系列を測定し、直線性を確認した。

結果を図2に示した。

#### 【0101】

グルコース量の測定方法

試料量  $3\mu\text{l}$  に試薬  $300\mu\text{l}$  を加え、試薬添加後2分後からの1分間における吸光度変化を求め、精製水及びグルコース100 mg/dl 標準液での2点検量線に基づき試料中のグルコース量を求めた。尚、測定装置は日立7150形自動分析装置を使用し、測定波長は、主波長480 nmのみ、測定温度は37℃で実施した。

図2より、0-600 mg/dl の範囲で良好な直線性が確認された。

#### 【0102】

Q76Kのマルトース作用性の確認

0.45 U/ml のQ76Kを含んだ下記反応試薬を調整した。

50 mM PIPES-NaOH緩衝液 (pH 6.5)

1 mM  $\text{CaCl}_2$

0.22% Triton-X100

0.4 mM PMS

0.26 mM WST-1 (同仁化学研究所製)

サンプルとしては100 mg/dl または300 mg/dl のグルコースをベースに0, 120, 240, 360 mg/dl のマルトースを上乗せした物を準備した。上記、グルコース量の測定方法に従い、測定を実施した。

マルトースを含まない100 mg/dl グルコース溶液と100とし、ベースに100 mg/dl のグルコースを含むサンプルの測定値をそれぞれ相対評価した。同様にマルトースを含まない300 mg/dl グルコース溶液と100とし、ベースに300 mg/dl のグルコースを含むサンプルの測定値をそれぞれ相対評価した。結果を図3に示す。

#### 【0103】

Q76Eのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Eを用いて作用性を評価した。酵素は、0.24 U/ml の濃度で添加した。結果を図4に示す。

#### 【0104】

Q168Vのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Vを用いて作用性を評価した。酵素は、0.35 U/ml の濃度で添加した。結果を図5に示す。

#### 【0105】

Q168Aのマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様にQ168Aを用いて作用性を評価した。酵素は、0.6 U/ml の濃度で添加した。結果を図6に示す。

#### 【0106】

野生型酵素のマルトース作用性の確認

Q76Kのマルトース作用性の確認同様に野生型酵素を用いて作用性を評価した。酵素は、0.1 U/ml の濃度で添加した。結果を図7に示す。

図3、図4、図5、図6、図7より、Q76K、Q76E、Q168V及びQ168Aは野生型酵素に比べ、マルトースに対する作用性が低下していることが確認された。

#### 【0107】

## 実施例 5: 変異ライブラリーの構築とスクリーニング

発現プラスミド pNPG5 をテンプレートとして、PCR 法により構造遺伝子中の 167-169 領域にランダム変異を導入した。PCR 反応は表 3 に示す組成の溶液中で、98℃ 2 分間、次に、98℃ 20 秒間、60℃ 30 秒間、及び 72℃ 4 分間を 30 サイクルの条件で行った。

【0108】

【表 3】

試薬	液量
KOD Dash DNA ポリメラーゼ (2.5 U/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
テンプレート DNA	1.0 $\mu$ l
フォワードプライマー (配列番号 12 に記載)	2.5 $\mu$ l
リバースプライマー (配列番号 13 に記載)	2.5 $\mu$ l
10× buffer	5.0 $\mu$ l
2mM dNTPs	5.0 $\mu$ l
H <sub>2</sub> O	33.0 $\mu$ l

【0109】

得られた変異ライブラリーを大腸菌 DH5 $\alpha$  に形質転換し、形成された各コロニーを 180  $\mu$ l/well の LB 培地 (100  $\mu$ g/ml のアンピシリンと 26  $\mu$ M の PQQ を含む) の分注されたマイクロタイタープレートに植菌し、37℃、24 時間培養した。培養液各 50  $\mu$ l を別のマイクロタイタープレートに移し、凍結融解の繰り返しによって培養菌体を破碎した後、遠心分離 (2000 rpm、10 分間) を行い、上清を回収した。回収した上清を 2 枚のマイクロタイタープレートに各 10  $\mu$ l 分注した。1 枚のマイクロタイタープレートはグルコースを基質とした活性測定試薬を用いて活性測定し、もう一枚はマルトースを基質とした活性測定試薬を用いて活性測定し、反応性を比較した。マルトースに対する反応性の変化したクローンが多数得られた。

マルトースに対する反応性の変化したクローンを LB 培地 (100  $\mu$ g/ml のアンピシリンと 26  $\mu$ M の PQQ を含む) 5 ml の分注された試験管で培養し、確認実験を行ったところ、マルトースに対する反応性の変化したクローンが多数得られた。

結果を表 4 に示す。

【0110】

【表 4】

変異箇所	マルチ作用性	変異箇所	マルチ作用性
N167E+Q168G+L169T	64%	N167S+Q168N+L169R	80%
Q168G+L169T	42%	N167G+Q168S+L169Y	55%
N167L+Q168S+L169G	45%	N167G+Q168S+L169S+L174F+K49N	39%
Q168N+L169N+S189R	51%	N167E+Q168G+L169A+S189G	58%
N167G+Q168R+L169A	66%	N167S+Q168G+L169A	48%
N167G+Q168V+L169S	42%	N167S+Q168V+L169S	71%
N167T+Q168I+L169G	42%	N167G+Q168W+L169N	72%
N167G+Q168S+L169N	50%	N167G+Q168S+L169V	36%
Q168R+L169C	29%	N167S+Q168L+L169G	41%
Q168C+L169S	33%	N167T+Q168N+L169K	68%
N167G+Q168T+L169A+S207C	24%	N167A+Q168A+L169P	63%
N167G+Q168S+L169G	34%	N167G+Q168G	46%
N167G+Q168D+L169K	35%	Q168P+L169G	23%
N167G+Q168N+L169S	59%	Q168S+L169G	22%
N188I+T349S	64%	N167G+Q168G+L169A+F215Y	32%
N167G+Q168T+L169G	28%	Q168G+L169V	43%
N167G+Q168V+L169T	43%	N167E+Q168N+L169A	52%
Q168R+L169A	72%	N167G+Q168R	23%
N167G+Q168T	69%	N167G+Q168T+L169Q	72%
Q168I+L169G+K300T	24%	N167G+Q168A	33%
N167T+Q168L+L169K	63%	N167M+Q168Y+L169G	60%
N167E+Q168S	32%	N167G+Q168T+L169V+S189G	42%
N167G+Q168G+L169C	37%	N167G+Q168K+L169D	41%
Q168A+L169D	16%	Q168S+E245D	29%
Q168S+L169S	26%	A351T	74%
N167S+Q168S+L169S	51%	Q168I+L169Q	51%
N167A+Q168S+L169S	40%	Q168A	35%
Q168S+L169P	20%	Q168A+L169G	16%
Q168S+L169E	15%		

## 【0111】

同様にして67-69領域（フォワードプライマー：配列番号14に記載、リバープライマー：配列番号15に記載を使用）、129-131領域（フォワードプライマー：配列番号16に記載、リバープライマー：配列番号17に記載を使用）、341-343領域（フォワードプライマー：配列番号18に記載、リバープライマー：配列番号19に記載を使用）にも変異導入した。また、428と429（フォワードプライマー：配列番号20に記載、リバープライマー：配列番号21に記載を使用）の間に挿入を試み

た。  
結果を表5に示す。

【0112】

【表5】

67-69領域

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
P67K+E68K	79%	P67R+E68R+I69C	80%
P67D+E68T+I69C	60%		

129-131領域

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
E129R+K130G+P131G	73%	E129Q+K130T+P131R	80%
E129N+P131T	67%	E129A+K130R+P131K	70%

341-343領域

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
E341L+M342P+A343R	80%	E341S+M342I	80%
A343I	45%	E341P+M342V+A343C	50%
E341P+M342V+A343R	76%	E341L+M342R+A343N	51%

428と429の間に挿入

挿入アミノ酸	マルトース 作用性	挿入アミノ酸	マルトース 作用性
L	73%	A	71%
K	79%		

【0113】

これらのうち、マルトースに対する作用性が大きく低下している変異体を選抜（Q168S+E245D、Q168A+L169D、Q168S+L169S、Q168S+L169E、Q168A+L169G、Q168S+L169P）し、これらの変異体からプラスミドを抽出し、実施例3並びに実施例4記載の方法に準じてシュードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表6に示す。

【0114】

【表 6】

変異	比活性	基質特異性	Km (Mal)	Km (Glc)	熱安定性
Q168S+E245D	714	29%	24.3	14.4	55.5%
Q168A+L169D	106	18%	65.9	20.8	89.4%
Q168S+L169S	288	33%	55.1	14.4	83.9%
Q168S+L169P	460	25%	87.1	24.1	76.3%
Q168A+L169G	170	18%	60.4	18.6	89.5%
Q168S+L169E	270	19%	70.7	8.9	63.3%
Q168A	313	43%			64.4%
野生型	1469	110%			59.8%

注) 比活性: 酵素活性 (U/ml) / A280nm の吸光度

## 【0115】

実施例 6: Q168 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 5 に記載の方法に準じて、Q168C、Q168D、Q168E、Q168F、Q168G、Q168H、Q168K、Q168L、Q168M、Q168N、Q168P、Q168R、Q168S、Q168T、Q168W、Q168Y の各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプライマーを表 7 に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表 8 に示す。更に、各変異体からプラスミドを抽出し、実施例 3 並びに実施例 4 に記載の方法に準じてシェードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表 9 に示す。

## 【0116】

【表 7】

変異箇所	フォワード プライマー	リバース プライマー
Q 1 6 8 C	配列番号 2 2	配列番号 2 3
Q 1 6 8 D	配列番号 2 2	配列番号 2 4
Q 1 6 8 E	配列番号 2 2	配列番号 2 5
Q 1 6 8 F	配列番号 2 2	配列番号 2 6
Q 1 6 8 G	配列番号 2 2	配列番号 2 7
Q 1 6 8 H	配列番号 2 2	配列番号 2 8
Q 1 6 8 K	配列番号 2 2	配列番号 2 9
Q 1 6 8 L	配列番号 2 2	配列番号 3 0
Q 1 6 9 M	配列番号 2 2	配列番号 3 1
Q 1 6 8 N	配列番号 2 2	配列番号 3 2
Q 1 6 8 P	配列番号 2 2	配列番号 3 3
Q 1 6 8 R	配列番号 2 2	配列番号 3 4
Q 1 6 8 S	配列番号 2 2	配列番号 3 5
Q 1 6 8 T	配列番号 2 2	配列番号 3 6
Q 1 6 8 W	配列番号 2 2	配列番号 3 7
Q 1 6 8 Y	配列番号 2 2	配列番号 3 8

【0 1 1 7】



【表 8】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
Q 1 6 8 C	5 4 %	Q 1 6 9 M	6 4 %
Q 1 6 8 D	2 9 %	Q 1 6 8 N	8 2 %
Q 1 6 8 E	3 6 %	Q 1 6 8 P	1 0 3 %
Q 1 6 8 F	4 3 %	Q 1 6 8 R	3 6 %
Q 1 6 8 G	4 6 %	Q 1 6 8 S	6 0 %
Q 1 6 8 H	5 5 %	Q 1 6 8 T	9 4 %
Q 1 6 8 K	8 3 %	Q 1 6 8 W	8 7 %
Q 1 6 8 L	9 2 %	Q 1 6 8 Y	9 3 %
野生型	1 0 4 %		

【0118】

【表 9】

変異	比活性	基質特異性	K <sub>m</sub> (Mal)	K <sub>m</sub> (Glc)	熱安定性
Q 1 6 8 C	55	5 8 %	20. 4	10. 7	18. 2%
Q 1 6 8 D	102	4 6 %	27. 4	—	61. 4%
Q 1 6 8 E	110	5 1 %	4. 7	8. 6	75. 4%
Q 1 6 8 F	137	5 2 %	36. 4	10. 3	55. 5%
Q 1 6 8 G	667	7 8 %	11. 1	—	78. 7%
Q 1 6 8 H	486	5 8 %	10. 2	5. 4	76. 0%
Q 1 6 8 K	5	8 0 %	9. 6	2. 2	—
Q 1 6 8 L	110	9 6 %	8. 6	4. 3	37. 1%
Q 1 6 9 M	190	6 8 %	22. 7	5. 3	78. 4%
Q 1 6 8 N	68	9 3 %	3. 6	4. 1	—
Q 1 6 8 P	128	1 0 6 %	3. 5	5. 1	82. 3%
Q 1 6 8 R	57	6 0 %	18. 4	3. 8	32. 9%
Q 1 6 8 S	483	8 1 %	12. 5	3. 7	80. 1%
Q 1 6 8 T	11	1 0 3 %	15. 0	6. 9	—
Q 1 6 8 W	287	9 6 %	5. 3	3. 2	59. 2%
Q 1 6 8 Y	297	9 9 %	12. 1	6. 9	100. 0%
野生型	1285	1 0 6 %	3. 8	6. 3	52. 2%

注) 比活性 : 酵素活性 (U/ml) / A280nm の吸光度

## 【0119】

実施例 7 : L 1 6 9 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、L 1 6 9 A, L 1 6 9 V, L 1 6 9 H、L 1 6 9 Y、L 1 6 9 K, L 1 6 9 D, L 1 6 9 S, L 1 6 9 N, L 1 6 9 G, L 1 6 9 C の各変異体を調製した。各変異体の調製に使用したプライマーを表 10 に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表 11 に示す。

## 【0120】

【表 10】

変異箇所	フォワード プライマー	リバースプライマー
L 1 6 9 A	配列番号 3 9	配列番号 3 9 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 V	配列番号 4 0	配列番号 4 0 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 Y	配列番号 4 1	配列番号 4 1 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 H	配列番号 4 2	配列番号 4 2 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 K	配列番号 4 3	配列番号 4 3 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 D	配列番号 4 4	配列番号 4 4 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 S	配列番号 4 5	配列番号 4 5 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 N	配列番号 4 6	配列番号 4 6 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 G	配列番号 4 7	配列番号 4 7 と相補的な合成オリゴヌクレオチド
L 1 6 9 C	配列番号 4 8	配列番号 4 8 と相補的な合成オリゴヌクレオチド

【0121】

【表 11】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
L 1 6 9 A	5 9 %	L 1 6 9 D	3 8 %
L 1 6 9 V	7 8 %	L 1 6 9 S	5 7 %
L 1 6 9 Y	1 0 7 %	L 1 6 9 N	7 4 %
L 1 6 9 H	8 5 %	L 1 6 9 G	4 8 %
L 1 6 9 K	6 0 %	L 1 6 9 C	5 7 %
野生型	9 7 %		

【0122】

実施例 8: Q168A 変異体に対する L169 部位の変異の組み合わせによる基質特異性への影響

実施例 5 に記載の方法に準じて、Q168A+L169A、Q168A+L169C、Q168A+L169E、Q168A+L169F、Q168A+L169H、Q168A+L169I、Q168A+L169K、Q168A+L169M、Q168A+L169N、Q168A+L169P、Q168A+L169Q、Q168A+L169R、Q168A+L169S、Q168A+L169T、Q168A+L169V、Q168A+L169W、Q168A+L169Y の各変異体を調製した。各変異体の調製に使用

したプライマーを表 12 に示す。また、調製した各変異体を用い、試験管培養にて調製した破碎液でマルトースに対する反応性を比較した結果を表 13 に示す。更に、各変異体からプラスミドを抽出し、実施例 3 並びに実施例 4 記載の方法に準じてシュードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表 14 に示す。

【0123】

【表 12】

変異箇所	フォワード プライマー	リバース プライマー
Q168A+L169A	配列番号 12	配列番号 49
Q168A+L169C	配列番号 12	配列番号 50
Q168A+L169E	配列番号 12	配列番号 51
Q168A+L169F	配列番号 12	配列番号 52
Q168A+L169H	配列番号 12	配列番号 53
Q168A+L169I	配列番号 12	配列番号 54
Q168A+L169K	配列番号 12	配列番号 55
Q168A+L169M	配列番号 12	配列番号 56
Q168A+L169N	配列番号 12	配列番号 57
Q168A+L169P	配列番号 12	配列番号 58
Q168A+L169Q	配列番号 12	配列番号 59
Q168A+L169R	配列番号 12	配列番号 60
Q168A+L169S	配列番号 12	配列番号 61
Q168A+L169T	配列番号 12	配列番号 62
Q168A+L169V	配列番号 12	配列番号 63
Q168A+L169W	配列番号 12	配列番号 64
Q168A+L169Y	配列番号 12	配列番号 65

【0124】

【表 13】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
Q168A+L169A	19%	Q168A+L169P	24%
Q168A+L169C	7%	Q168A+L169Q	42%
Q168A+L169E	17%	Q168A+L169R	42%
Q168A+L169F	22%	Q168A+L169S	14%
Q168A+L169H	21%	Q168A+L169T	24%
Q168A+L169I	43%	Q168A+L169V	34%
Q168A+L169K	21%	Q168A+L169W	33%
Q168A+L169M	22%	Q168A+L169Y	37%
Q168A+L169N	19%	野生型	104%

【0125】

【表 14】

変異	比活性	基質特異性	Km (Mal)	Km (Gl c)	熱安定性
Q168A+L169A	154	19%	126	33.0	86.2%
Q168A+L169C	63	13%	103	35.6	100.0%
Q168A+L169E	90	19%	8.6	20.4	100.0%
Q168A+L169F	138	27%	44.7	10.4	80.4%
Q168A+L169H	70	27%	99.2	15.5	100.0%
Q168A+L169I	43	53%	12.5	6.0	28.7%
Q168A+L169K	129	20%	20.4	26.7	100.0%
Q168A+L169M	80	23%	52.3	15.6	—
Q168A+L169N	167	22%	59.1	34.5	83.5%
Q168A+L169P	377	24%	58.0	13.9	79.9%
Q168A+L169Q	117	49%	156.9	5.4	100.0%
Q168A+L169R	32	45%	59.0	9.6	100.0%
Q168A+L169S	42	24%	15.6	21.0	—
Q168A+L169T	98	23%	33.5	15.2	83.7%
Q168A+L169V	41	27%	49.1	24.7	40.4%
Q168A+L169W	91	38%	63.3	10.8	49.4%
Q168A+L169Y	31	52%	13.6	11.6	74.3%
野生型	1285	106%	3.8	6.3	52.2%

注) 比活性: 酵素活性 (U/ml) / A280nm の吸光度

## 【0126】

実施例 9: A170 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、A170C、A170D、A170E、A170F、A170G、A170H、A170K、A170L、A170M、A170N、A170P、A170R、A170S、A170T、A170W、A170Y、A170V、A170I、A170Q の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 69 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 69 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 15 に示す。

## 【0127】

【表 15】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
A170G	98%	A170K	87%
A170V	91%	A170R	108%
A170L	86%	A170C	92%
A170I	85%	A170M	90%
A170S	100%	A170F	82%
A170T	92%	A170Y	88%
A170D	102%	A170W	79%
A170E	103%	A170H	98%
A170N	100%	A170P	28%
A170Q	99%	野生型	98%

## 【0128】

実施例 10: E245 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、E245C、E245D、E245A、E245F、E245G、E245H、E245K、E245L、E245M、E245N、E245P、E245R、E245S、E245T、E245W、E245Y、E245V、E245I、E245Q の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 70 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 70 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 16 に示す。

## 【0129】

【表 16】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
E245A	99%	E245Q	72%
E245D	49%	E245S	98%
E245F	64%	E245T	89%
E245H	54%	E245V	85%
E245I	114%	E245W	92%
E245K	活性消失	E245Y	活性消失
E245L	活性消失	E245R	94%
E245M	69%	E245G	92%
E245N	59%	E245C	75%
E245P	活性消失	野生型	99%

## 【0130】

実施例 11: N249 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、N249C、N249D、N249A、N249F、N249G、N249H、N249K、N249L、N249M、N249E、N249P、N249R、N249S、N249T、N249W、N249V、N249I、N249Q の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 71 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 71 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 17 に示す。

## 【0131】



【表 17】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
N249G	82%	N249K	184%
N249A	77%	N249R	191%
N249V	157%	N249C	107%
N249L	94%	N249M	170%
N249I	137%	N249F	活性消失
N249S	活性消失	N249W	活性消失
N249T	活性消失	N249H	343%
N249D	活性消失	N249P	活性消失
N249E	86%	野生型	106%
N249Q	79%		

## 【0132】

実施例 12: E245D 変異の組み合わせによる基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、(Q168A+L169G+E245D)、(Q168A+L169P+E245D) の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 72 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 72 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。また、鋳型 DNA としては実施例 8 で取得した (Q168A+L169G) または (Q168A+L169P) の plasmid を使用した。調製した変異体からプラスミドを抽出し、実施例 3 並びに実施例 4 記載の方法に準じてシュードモナスを形質転換してホロ型酵素を発現し、精製酵素を取得して特性を評価した。結果を表 18 に示す。

## 【0133】

【表 18】

変異	比活性	基質特異性	Km (Mal)	Km (Glc)	熱安定性
Q168A+L169G+E245D	138	11%	228.8	59.5	97.2
Q168A+L169P+E245D	382	15%	126.8	41.6	86.2
野生型	1285	107%	3.8	6.3	49.6%

## 【0134】

実施例 13: T349 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、T349S、T349P、T349Y の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 73 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 73 と相補的な合成オリゴヌクレオ

チド使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 19 に示す。

【0135】

【表19】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
T 3 4 9 S	4 9 %	T 3 4 9 Y	9 0 %
T 3 4 9 P	3 2 %		

【0136】

実施例 14 : N 4 2 9 部位の変異による基質特異性への影響

実施例 2 に記載の方法に準じて、N 4 2 9 F、N 4 2 9 P、N 4 2 9 L、N 4 2 9 Y の各変異体を調製した。各変異体の調製にはフォワードプライマーとして配列番号 7 4 記載の合成オリゴヌクレオチドを、リバースプライマーとして配列番号 7 4 と相補的な合成オリゴヌクレオチドを使用した。調製した変異ライブラリーをスクリーニングして目的の変異体を取得した。試験管培養にて調製した破碎液を用いてマルトースに対する反応性を比較した結果を表 20 に示す。

【0137】

【表20】

変異箇所	マルトース 作用性	変異箇所	マルトース 作用性
N 4 2 9 F	6 9 %	N 4 2 9 L	9 7 %
N 4 2 9 P	4 4 %	N 4 2 9 Y	6 8 %

【産業上の利用可能性】

【0138】

本発明によれば、基質特異性及び／又は熱安定性が改善された P Q Q G D H を得ることができる。この改変型 P Q Q G D H は、グルコースアッセイキット、グルコースセンサに利用できる。

【図面の簡単な説明】

【0139】

【図1】 Q 7 6 N、Q 7 6 E、Q 1 6 8 I、Q 1 6 8 V、Q 7 6 T、Q 7 6 M、Q 1 6 8 A、野生型、Q 7 6 G、Q 7 6 K の至適 pH の測定結果を示す。横軸は pH、縦軸は相対活性を示す。図中、黒丸 (Acetate) が 0.22% Triton-X 100 を含む 50 mM 酢酸緩衝液 (pH 3.0~6.0) で酵素活性を測定した結果である。同様に、黒四角 (PIPES) が 0.22% Triton-X 100 を含む 50 mM PIPES-NaOH 緩衝液 (pH 6.0~7.0)、黒三角 (K

—PB) が 0.22% Triton-X100 を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 5.0~8.0)、黒菱形 (Tris-HCl) が 0.22% Triton-X100 を含む 50mM トリス塩酸緩衝液 (pH 7.0~9.0) 中でそれぞれ酵素活性を測定した結果である。なお測定値は最大活性を示したものを 100% とした相対値で示している。

【図 2】Q76K のグルコース定量性の確認結果を示す。横軸は 1 水準の希釈系列、縦軸はグルコース濃度の測定値 (mg/dl) を示す。

【図 3】Q76K のマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が 0 のときの測定値を 100% としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして 100mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして 300mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図 4】Q76E のマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が 0 のときの測定値を 100% としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして 100mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして 300mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図 5】Q168V のマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が 0 のときの測定値を 100% としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして 100mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして 300mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図 6】Q168A のマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が 0 のときの測定値を 100% としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして 100mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして 300mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

【図 7】野生型酵素のマルトース作用性の確認結果を示す。横軸は、上乗せしたマルトース濃度 (mg/dl)、縦軸はマルトース添加濃度が 0 のときの測定値を 100% としたときの相対%を示す。図中、黒三角はサンプルとして 100mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合、黒菱形はサンプルとして 300mg/dl のグルコースをベースにマルトースを上乗せした場合をそれぞれ示す。

## 【配列表】

## SEQUENCE LISTING

&lt;110&gt; Toyo Boseki Kabushiki Kaisya

&lt;120&gt; PQQ dependent glucose dehydrogenase

&lt;130&gt; 04-0177

&lt;160&gt; 74

&lt;170&gt; PatentIn version 3.1

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 455

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Acinetobacter baumannii

&lt;400&gt; 1

Asp Ile Pro Leu Thr Pro Ala Gln Phe Ala Lys Ala Lys Thr Glu Asn  
 1 5 10 15

Phe Asp Lys Lys Val Ile Leu Ser Asn Leu Asn Lys Pro His Ala Leu  
 20 25 30

Leu Trp Gly Pro Asp Asn Gln Ile Trp Leu Thr Glu Arg Ala Thr Gly  
 35 40 45

Lys Ile Leu Arg Val Asn Pro Val Ser Gly Ser Ala Lys Thr Val Phe  
 50 55 60

Gln Val Pro Glu Ile Val Ser Asp Ala Asp Gly Gln Asn Gly Leu Leu  
 65 70 75 80

Gly Phe Ala Phe His Pro Asp Phe Lys His Asn Pro Tyr Ile Tyr Ile  
 85 90 95

Ser Gly Thr Phe Lys Asn Pro Lys Ser Thr Asp Lys Glu Leu Pro Asn  
 100 105 110

Gln Thr Ile Ile Arg Arg Tyr Thr Tyr Asn Lys Thr Thr Asp Thr Phe  
 115 120 125

Glu Lys Pro Ile Asp Leu Ile Ala Gly Leu Pro Ser Ser Lys Asp His  
130 135 140

Gln Ser Gly Arg Leu Val Ile Gly Pro Asp Gln Lys Ile Tyr Tyr Thr  
145 150 155 160

Ile Gly Asp Gln Gly Arg Asn Gln Leu Ala Tyr Leu Phe Leu Pro Asn  
165 170 175

Gln Ala Gln His Thr Pro Thr Gln Gln Glu Leu Asn Ser Lys Asp Tyr  
180 185 190

His Thr Tyr Met Gly Lys Val Leu Arg Leu Asn Leu Asp Gly Ser Val  
195 200 205

Pro Lys Asp Asn Pro Ser Phe Asn Gly Val Val Ser His Ile Tyr Thr  
210 215 220

Leu Gly His Arg Asn Pro Gln Gly Leu Ala Phe Ala Pro Asn Gly Lys  
225 230 235 240

Leu Leu Gln Ser Glu Gln Gly Pro Asn Ser Asp Asp Glu Ile Asn Leu  
245 250 255

Val Leu Lys Gly Gly Asn Tyr Gly Trp Pro Asn Val Ala Gly Tyr Lys  
260 265 270

Asp Asp Ser Gly Tyr Ala Tyr Ala Asn Tyr Ser Ala Ala Thr Asn Lys  
275 280 285

Ser Gln Ile Lys Asp Leu Ala Gln Asn Gly Ile Lys Val Ala Thr Gly  
290 295 300

Val Pro Val Thr Lys Glu Ser Glu Trp Thr Gly Lys Asn Phe Val Pro  
305 310 315 320

Pro Leu Lys Thr Leu Tyr Thr Val Gln Asp Thr Tyr Asn Tyr Asn Asp  
325 330 335

Pro Thr Cys Gly Glu Met Ala Tyr Ile Cys Trp Pro Thr Val Ala Pro  
340 345 350

Ser Ser Ala Tyr Val Tyr Thr Gly Gly Lys Lys Ala Ile Pro Gly Trp  
355 360 365

Glu Asn Thr Leu Leu Val Pro Ser Leu Lys Arg Gly Val Ile Phe Arg  
370 375 380

Ile Lys Leu Asp Pro Thr Tyr Ser Thr Thr Leu Asp Asp Ala Ile Pro  
385 390 395 400

Met Phe Lys Ser Asn Asn Arg Tyr Arg Asp Val Ile Ala Ser Pro Glu  
405 410 415

Gly Asn Thr Leu Tyr Val Leu Thr Asp Thr Ala Gly Asn Val Gln Lys  
420 425 430

Asp Asp Gly Ser Val Thr His Thr Leu Glu Asn Pro Gly Ser Leu Ile  
435 440 445

Lys Phe Thr Tyr Asn Gly Lys  
450 455

<210> 2  
<211> 1368  
<212> DNA  
<213> Acinetobacter baumannii

<400> 2  
gatatacctc tgacacctgc tcagttcgca aaagcgaaaa cagaaaattt tgataaaaaa 60  
gtgattctgt ccaatttaaa taaaccacat gctttgttat gggggccaga taatcaaatt 120  
tggttaaccg aacgtgcaac tggcaaaatt ttaagagtaa atcctgtatc tggtagcgcg 180  
aaaacagtat ttcaggittcc tgaaattgtg agtgatgctg atgggcaaaa tggtttgta 240

ggTTTTgctt tTcatcctga cTTtaaacat aacccttata tctatatttc aggcactttt 300  
 aaaaatccaa aatctacaga taaagagtta cctaatacaga cgattattcg tagatatacc 360  
 tataataaaa ctacagatac atttgaaaag cctattgatt tgattgcagg tttaccgtca 420  
 tcaaaagatc atcagtctgg tcgtctcggt attgggtccag accaaaaaat ctactatacg 480  
 attgggtgacc aaggctgtaa tcagttagct tatctgttct taccgaatca ggcacagcat 540  
 actccgactc agcaagagct caatagtaaa gactaccata catatatggg taaagtatta 600  
 cgcttaaatc tggacggcag tgtacctaaa gacaacccaa gctttaacgg cgtagtgagt 660  
 catatctaca ctttagggca ccgtaatcca caaggtttag catttgcccc aaatggaaag 720  
 cttttacaat ctgagcaagg accaaattct gatgatgaaa ttaaccttgt attaaaaggt 780  
 ggtaactatg gctggccaaa tgtagctgggt tataaagatg acagtgggta tgcctatgca 840  
 aactattcgg cagcaaccaa taaatcacia attaaagatt tagctcaaaa cgggataaaa 900  
 gtagcaacag gtgttcctgt gactaaagag tctgaatgga ctggtaaaaa ctttgtgccg 960  
 ctttgaaaa ctttatatac ggtacaagat acctataact ataatgacct tacttgttgt 1020  
 gagatggcat atatttgctg gccaacgggt gcaccgtcat cagcatatgt atatacggga 1080  
 ggcaaaaaag cgattccagg gtgggaaaat acattattgg tcccatcttt aaaacgtggg 1140  
 gtgattttcc gtattaaatt ggaçccgaca tatagcacga ctttggatga tgctatccca 1200  
 atgttttaaaa gcaataaccg ttatcgtgat gtcacgcta gtccagaagg taatacctta 1260  
 tatgtgctga ctgatacagc ggggaatgta caaaaagatg atggttctgt cactcatact 1320  
 ttagagaatc ccggttctct cattaaattt acatataacg gtaagtaa 1368

<210> 3  
 <211> 33  
 <212> DNA  
 <213> Artificial

<220>  
 <223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 3  
 agtgatgctg atgggaataa tggtttgta ggt

33

<210> 4  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 4  
agtgatgctg atggggagaa tggtttgta ggt 33

<210> 5  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 5  
agtgatgctg atgggacaaa tggtttgta ggt 33

<210> 6  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 6  
agtgatgctg atgggatgaa tggtttgta ggt 33

<210> 7  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 7  
agtgatgctg atggggggaa tggtttgta ggt 33

<210> 8



<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 8  
agtgatgctg atgggaagaa tggtttgta ggt 33

<210> 9  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 9  
gaccaaggtc gtaatatttt agcttatctg ttc 33

<210> 10  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 10  
gaccaaggtc gtaatgtatt agcttatctg ttc 33

<210> 11  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 11  
gaccaaggtc gtaatgcatt agcttatctg ttc 33

<210> 12  
<211> 43  
<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 12

cgaatcaggc acagcatact ccgactcagc aagagctcaa tag

43

<210> 13

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)..(25)

<223> n stands for any base

<400> 13

gtaagaacag ataagcnnnn nnnnnacgac cttgggtcacc aatcg

45

<210> 14

<211> 40

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 14

gatgctgatg ggcaaaatgg ttgttaggt ttgcttttc

40

<210> 15

<211> 38

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(15)

<223>

<220>

<221> misc\_feature

<222> (7)..(15)

<223> n stands for any base

<400> 15

actcacnnnn nnnnnaacct gaaatactgt tttcgcg

38

<210> 16

<211> 50

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 16

tttaccgtca tcaaaagatc atcagtctgg tcgtctcggt attgggtccag

50

<210> 17

<211> 52

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (18)..(26)

<223> n stands for any base

<400> 17

cctgcaatca aatcaatnnn nnnnnnaaat gtatctgtag ttttattata gg

52

<210> 18

<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 18  
acggttgac cgtcatcagc atatgtatat acgggaggc

39

<210> 19  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (16)..(24)  
<223> n stands for any base

<400> 19  
tggccagcaa atatannnnn nnnnaccaca agtagggtc

39

<210> 20  
<211> 34  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 20  
atggttctgt cactcact ttagagaatc ccgg

34

<210> 21  
<211> 35  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(19)  
<223> n stands for any base

<400> 21  
catctttttg tacattnnnc cccgctgtat cagtc

35

<210> 22  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 22  
ttaccgaatc aggcacagca tactccgact cag 33

<210> 23  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 23  
gaacagataa gctaagcaat tacgaccttg gtc 33

<210> 24  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 24  
gaacagataa gctaartcat tacgaccttg gtc 33

<210> 25  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 25  
gaacagataa gctaaytcat tacgaccttg gtc 33

<210> 26  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 26  
gaacagataa gctaaraaat tacgaccttg gtc 33

<210> 27  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 27  
gaacagataa gctaagccat tacgaccttg gtc 33

<210> 28  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 28  
gaacagataa gctaartgat tacgaccttg gtc 33

<210> 29  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 29  
gaacagataa gctaayttat tacgaccttg gtc 33

<210> 30  
<211> 33

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (16)..(16)  
<223> n stands for any base

<400> 30  
gaacagataa gctaanagat tacgaccttg gtc

33

<210> 31  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 31  
gaacagataa gctaacatat tacgaccttg gtc

33

<210> 32  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 32  
gaacagataa gctaarttat tacgaccttg gtc

33

<210> 33  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

<223> n stands for any base

<400> 33

gaacagataa gctaanggat tacgaccttg gtc

33

<210> 34

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (16)..(16)

<223> n stands for any base

<400> 34

gaacagataa gctaancgat tacgaccttg gtc

33

<210> 35

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 35

gaacagataa gctaagctat tacgaccttg gtc

33

<210> 36

<211> 33

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 36

gaacagataa gctaacgtat tacgaccttg gtc

33



<210> 37  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 37  
gaacagataa gctaaccaat tacgaccttg gtc 33

<210> 38  
<211> 33  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 38  
gaacagataa gctaartaat tacgaccttg gtc 33

<210> 39  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 39  
gaccaagggtc gtaatcaggc agcttatctg ttcttacgg 39

<210> 40  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 40  
gaccaagggtc gtaatcagggt tgcttatctg ttcttacgg 39

<210> 41  
<211> 39

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 41  
gaccaaggctc gtaatcagta tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 42  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 42  
gaccaaggctc gtaatcagca tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 43  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 43  
gaccaaggctc gtaatcagaa agcttatctg ttcttaccg 39

<210> 44  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 44  
gaccaaggctc gtaatcagga tgcttatctg ttcttaccg 39

<210> 45  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;400&gt; 45

gaccaaggctc gtaatcagtc agcttatctg ttcttaccg

39

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;400&gt; 46

gaccaaggctc gtaatcagaa tgcttatctg ttcttaccg

39

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;400&gt; 47

gaccaaggctc gtaatcaggg agcttatctg ttcttaccg

39

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 39

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;400&gt; 48

gaccaaggctc gtaatcagtg tgcttatctg ttcttaccg

39

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>

<221> misc\_feature

<222> (17)..(17)

<223> n stands for any base

<400> 49

gtaagaacag ataagcngat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 50

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 50

gtaagaacag ataagcrcat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 51

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 51

gtaagaacag ataagcytct gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 52

<211> 45

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 52

gtaagaacag ataagcraat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 53

<211> 45

<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 53  
gtaagaacag ataagcrtgt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 54  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 54  
gtaagaacag ataagcdatt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 55  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 55  
gtaagaacag ataagcyttt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 56  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 56  
gtaagaacag ataagccatt gcattacgac cttggtcacc aatcg 45

<210> 57  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;400&gt; 57

gtaagaacag ataagcrttt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

&lt;210&gt; 58

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (17)..(17)

&lt;223&gt; n stands for any base

&lt;400&gt; 58

gtaagaacag ataagcnggt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

&lt;210&gt; 59

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;400&gt; 59

gtaagaacag ataagcytgt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

&lt;210&gt; 60

&lt;211&gt; 45

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; Artificial

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Artificial Sequence oligonucleotide

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (17)..(17)

&lt;223&gt; n stands for any base

<400> 60  
gtaagaacag ataagcncgt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 61  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(17)  
<223> n stands for any base

<400> 61  
gtaagaacag ataagcngat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 62  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(17)  
<223> n stands for any base

<400> 62  
gtaagaacag ataagcngtt gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 63  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (17)..(17)  
<223> n stands for any base

<400> 63  
gtaagaacag ataagcnact gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 64  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 64  
gtaagaacag ataagcccat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 65  
<211> 45  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 65  
gtaagaacag ataagcrtat gcattacgac cttggtcacc aatcg

45

<210> 66  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 66  
gaccaaggtc gtaatagtga ggcttatctg ttctta

36

<210> 67  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial



<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 67  
gaccaaggtc gtaatagtcc cgcttatctg ttctta 36

<210> 68  
<211> 36  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 68  
gaccaaggtc gtaatgcagg cgcttatctg ttctta 36

<210> 69  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)..(20)  
<223> n stands for any base

<400> 69  
caaggtcgta atcagttann statctgttc ttaccgaat 39

<210> 70  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)..(20)  
<223> n stands for any base

<400> 70  
ggaaagcttt tacaatctnn scaaggacca aattctgat 39

<210> 71  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<220>  
<221> misc\_feature  
<222> (19)..(20)  
<223> n stands for any base

<400> 71  
caatctgagc aaggaccann stctgatgat gaaattaac 39

<210> 72  
<211> 38  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 72  
gcttttacaa tctgaccaag gaccaaattc tgatgatg 38

<210> 73  
<211> 39  
<212> DNA  
<213> Artificial

<220>  
<223> Artificial Sequence oligonucleotide

<400> 73  
ggcatatatt tgctggccan nngttgcacc gtcatcagc 39

<210> 74  
<211> 39

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> Artificial Sequence oligonucleotide

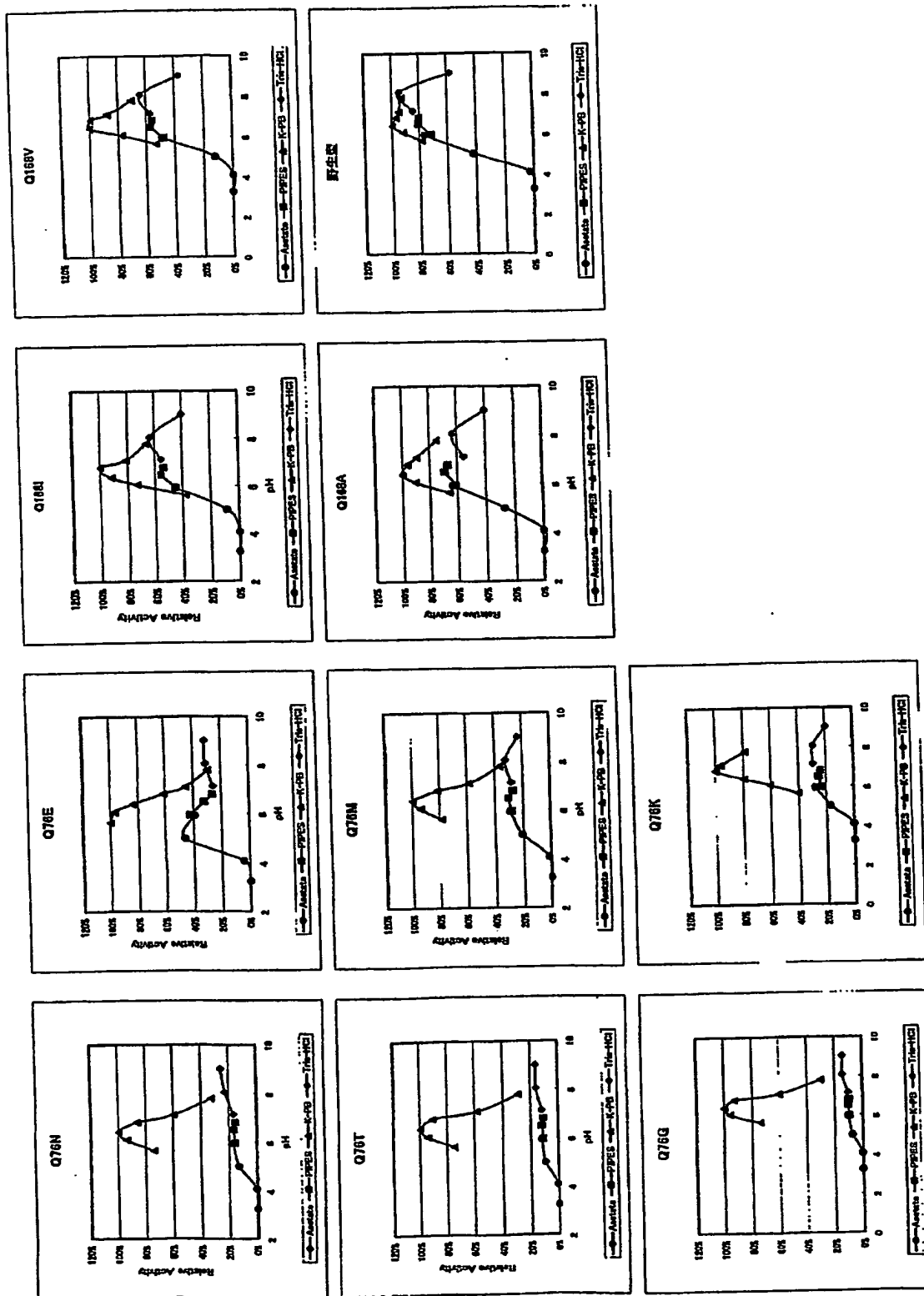
<400> 74

gctgactgat acagcggggn nngtacaaaa agatgatgg

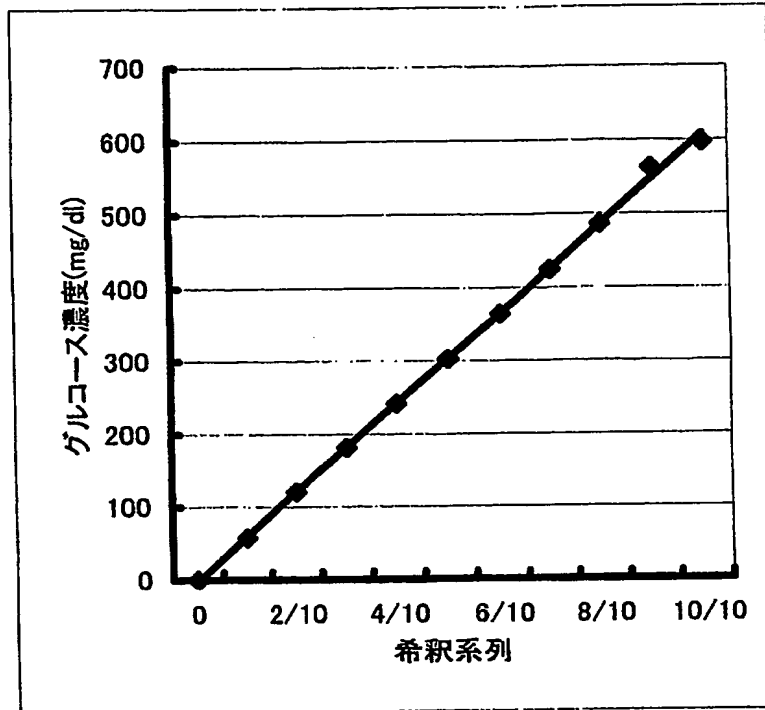
39

【書類名】図面

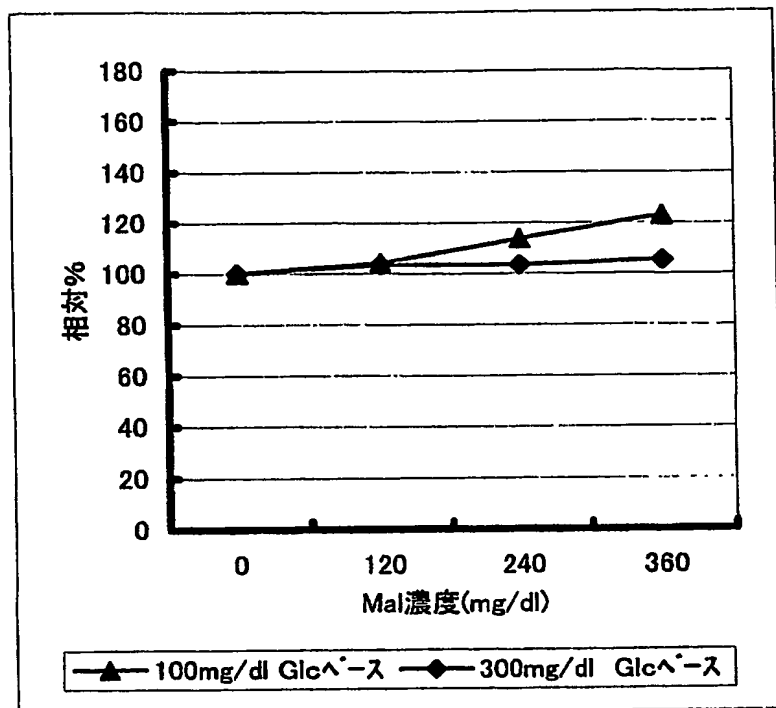
【図1】



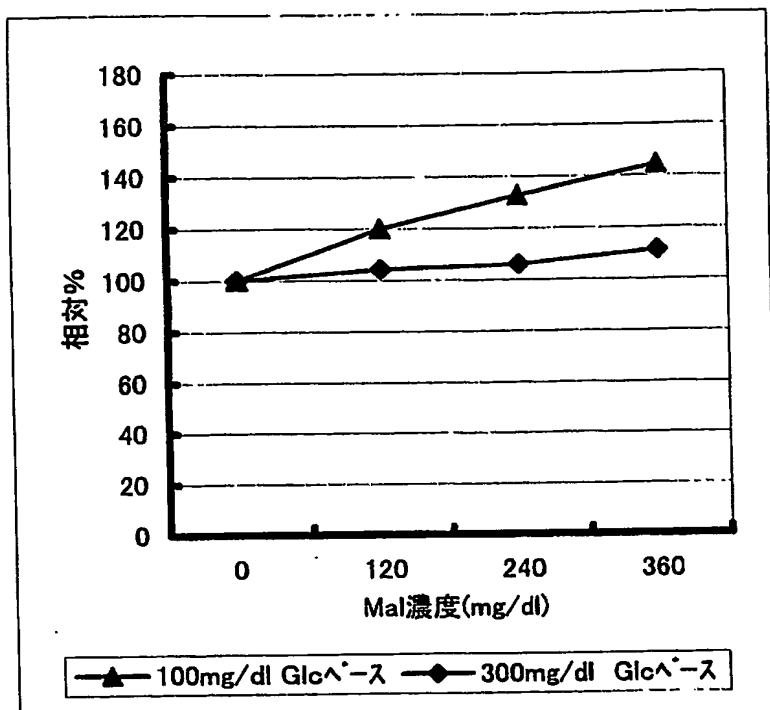
【図 2】



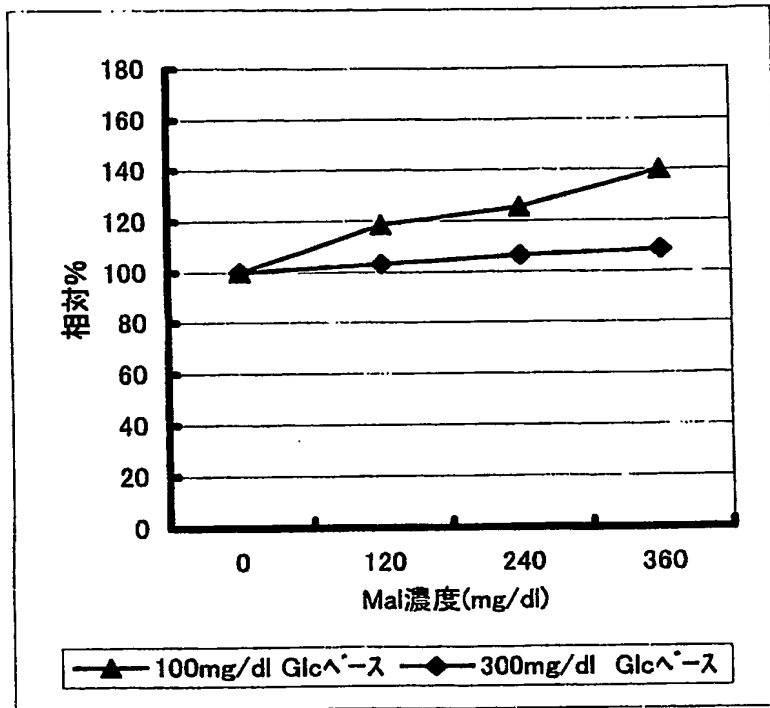
【図 3】



【図 4】

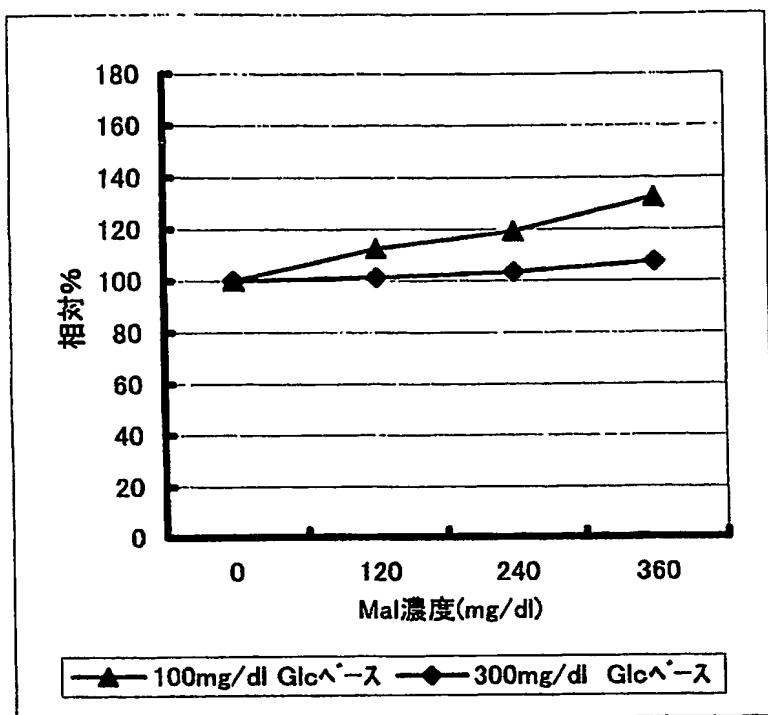


【図 5】

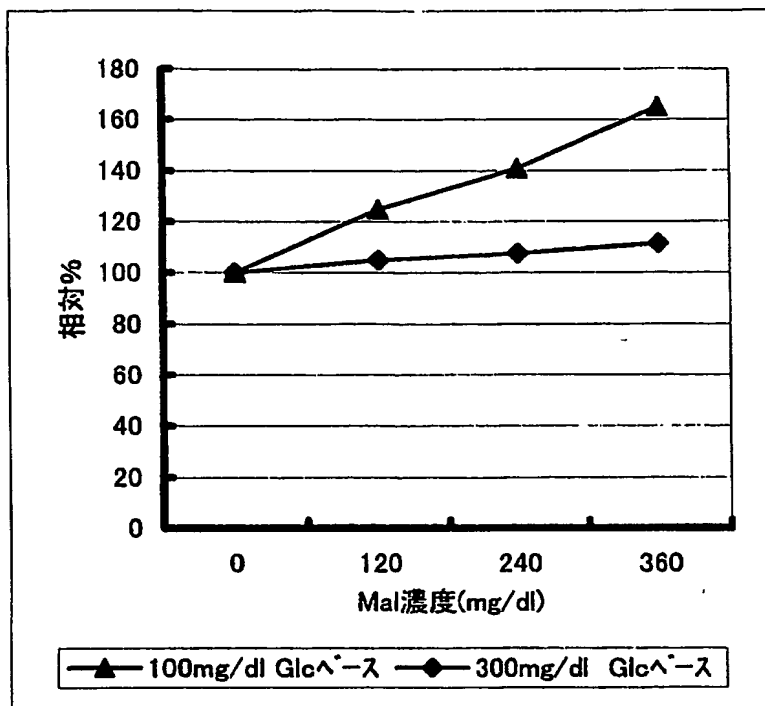




【図 6】



【図 7】



【書類名】 要約書

【要約】

【課題】

基質特異性及び／又は熱安定性が改善された PQQGDH を提供する。

【解決手段】

本発明は、野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（PQQGDH）よりも二糖類に対する作用性が低下した改変型 PQQGDH、及び／または、野生型のピロロキノリンキノン依存性グルコースデヒドロゲナーゼ（PQQGDH）よりも安定性が向上した改変型 PQQGDH。

特願 2 0 0 4 - 0 6 0 2 8 3

出 願 人 履 歴 情 報

識別番号

[ 0 0 0 0 0 3 1 6 0 ]

1. 変更年月日

1 9 9 0 年 8 月 1 0 日

[変更理由]

新規登録

住 所

大阪府大阪市北区堂島浜 2 丁目 2 番 8 号

氏 名

東洋紡績株式会社

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning  
Operations and is not part of the Official Record**

**BEST AVAILABLE IMAGES**

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☒ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☒ FADED TEXT OR DRAWING
- ☒ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: \_\_\_\_\_

**IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.**

**As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.**